

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DOENÇAS INFECCIOSAS

DEBORA GOLDNER ROSSI

***Strongyloides venezuelensis* Brumpt, 1934: AVALIAÇÃO DE ALGUNS  
ASPECTOS DO CICLO INDIRETO**

VITÓRIA

2018

DEBORA GOLDNER ROSSI

***Strongyloides venezuelensis* Brumpt, 1934: AVALIAÇÃO DE ALGUNS  
ASPECTOS DO CICLO INDIRETO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Doenças Infecciosas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Doenças Infecciosas.

Orientador: Prof. Dr. Fausto Edmundo Lima Pereira

Coorientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Narcisa Imaculada Brant Moreira

VITÓRIA

2018

Dados Internacionais de Catalogação-na-publicação (CIP)  
(Biblioteca Setorial do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do  
Espírito Santo, ES, Brasil)

---

R831s Rossi, Debora Goldner, 1992 -  
*Strongyloides venezuelensis* Brumpt, 1934 : avaliação de alguns  
aspectos do ciclo indireto / Debora Goldner Rossi - 2018.  
88 f. : il.

Orientador: Fausto Edmundo Lima Pereira.  
Coorientador: Narcisa Imaculada Brant Moreira.

Dissertação (Mestrado em Doenças Infecciosas ) – Universidade Federal  
do Espírito Santo, Centro de Ciências da Saúde.

1. Strongyloides. 2. Fezes. 3. Partenogênese. I. Pereira, Fausto  
Edmundo Lima. II. Moreira, Narcisa Imaculada Brant. III. Universidade  
Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências da Saúde. IV. Título.

CDU: 61

---

Elaborado por Rafael Lima de Carvalho – CRB-6 MG-002926/O



## PARECER ÚNICO DA COMISSÃO JULGADORA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

A mestrand **Debora Goldner Rossi** apresentou a dissertação intitulada "***Strongyloides venezuelensis* (Brumpt, 1934): AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DE FATORES AMBIENTAIS E DO HOSPEDEIRO NO DESENVOLVIMENTO DAS FORMAS DE VIDA LIVRE E CARACTERIZAÇÃO DO CICLO INDIRETO**" em sessão pública, como requisito final para obtenção do título de Mestre em Doenças Infecciosas, do Programa de Pós-Graduação em Doenças Infecciosas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo.

Considerando a apresentação oral dos resultados, sua qualidade e relevância, a Comissão Examinadora decidiu (X) **aprovar** ( ) **reprovar** a dissertação habilitando a farmacêutica **DEBORA GOLDNER ROSSI** a obter o Grau de **MESTRE EM DOENÇAS INFECCIOSAS**.

Vitória, ES, 17 de maio de 2018.

Prof.ª Dr.ª Blima Fux

(Membro Interno)

Prof. Dr. Hudson Alves Pinto

(Membro Externo)

Prof. Dr. Fausto Edmundo Lima Pereira

(Orientador)

Dedico este trabalho a Deus, criador de todas as coisas, inclusive os parasitos.

Aos inúmeros roedores que perderam a vida para a realização desta pesquisa.

A minha família e a todos os meus amigos pela presença constante e encorajamento durante esta jornada.

*“Se um dia tudo lhe parecer perdido,  
lembre-se de que você nasceu sem  
nada, e que tudo que conseguiu foi  
através de esforços e os esforços  
nunca se perdem, somente dignificam  
as pessoas.”*

*Charles Chaplin*

*“Direi do Senhor: Ele é o meu Deus, o  
meu refúgio, a minha fortaleza, e nele  
confiarei”.*

*Salmos 91:2*

## AGRADECIMENTOS

A Deus, a verdadeira fonte de sabedoria, pela saúde, força e disposição. Por abrir os meus caminhos, por propiciar os encontros com todos os que me trouxeram até aqui, por alimentar a minha fé.

Aos meus pais, José e Judithe, meus exemplos de vida, e a meu irmão Tiago, por todo amor, carinho e incentivo, imprescindíveis para minha formação.

Ao meu orientador Prof. Fausto Edmundo Lima Pereira, que acreditou em meu potencial e que não mediu esforços em dedicar a mim suas lições de saber, sua experiência e competência profissional. Agradeço pela amizade, diligência, paciência, compreensão, entusiasmo e incentivo.

A minha coorientadora Prof<sup>a</sup>. Narcisa Imaculada Brant Moreira, pelo incentivo, apoio, pela atenção, oportunidade, paciência e confiança durante esses anos e por todas as sugestões oferecidas para a melhoria deste trabalho.

Ao meu grande amigo Dr. Steveen Rios Ribeiro, pelo papel de mentor, pela valiosíssima contribuição e disposição em me ajudar em todos os momentos e principalmente por sua dedicação em me auxiliar com a técnica de Biologia Molecular. Agradeço por ter compartilhado comigo seus conhecimentos e experiências, com paciência, simplicidade e carinho, e por me ensinar a ser perseverante. A conclusão deste trabalho não seria possível sem o seu inestimável apoio. A você, o meu MUITO OBRIGADA, mesmo ciente de que quaisquer que sejam as palavras, jamais conseguirão expressar toda a minha gratidão.

A minha grande amiga Mestra Caroline Ohnesorge Maia, pela receptividade quando cheguei ao laboratório, pelo apoio e incentivo.

A Katlin Francisca dos Santos, pela amizade e auxílio em algumas inoculações.

A Doutoranda Luciana Matos de Abreu Stanzani, a Dra. Cynara Oliveira Possamai e ao Dr. Rodrigo Pratte, pela amizade e apoio.

Ao Prof. Alan Lane de Melo, do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, por gentilmente ter nos cedido a cepa de *Strongyloides venezuelensis*.

Ao Prof. Luiz Carlos Shenberg, do Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, por gentilmente ter nos cedido os ratos híbridos selvagens.

A Prof<sup>a</sup>. Mônica Regina Vendrame Amarante, da UNESP de Botucatu-SP, pela disponibilidade e atenção em nos ceder DNA de sua cepa de *Strongyloides venezuelensis* utilizado como controle positivo em nossa técnica de Biologia Molecular.

Ao Prof. Pedro Fernández-Soto, do Centro de Investigación de Enfermedades Tropicales da Universidade de Salamanca – Espanha, por responder com solicitude nossas dúvidas sobre a *Touchdown PCR*.

Ao Laboratório de Protozoologia, sob responsabilidade da Prof<sup>a</sup>. Cinthia Furst Leroy Gomes Bueloni, pelo suporte físico para a execução de parte da técnica de Biologia Molecular.

Ao Prof. Aloísio Falqueto, pela permissão do uso do nitrogênio líquido de seu laboratório.

Ao Laboratório Multiusuário de Análises Biomoleculares (LABIOM), sob responsabilidade do Prof. Alexandre Martins Costa Santos, pela permissão do uso do NanoDrop.

Ao Prof. Daniel Cláudio de Oliveira Gomes, por disponibilizar o Laboratório de Imunopatologia para extração de DNA.

A Universidade Federal do Espírito Santo pela formação profissional.

Ao Programa de Pós-Graduação em Doenças Infecciosas pela oportunidade de realizar esta pesquisa.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo auxílio financeiro.

A todos aqueles, que de alguma forma, contribuíram para a conclusão desse estudo. Muito Obrigada!



## RESUMO

**Introdução.** *Strongyloides venezuelensis* (Brumpt, 1934), tem sido utilizado como modelo experimental da estrongiloidíase e apresenta ciclo de vida complexo e mal conhecido, com alternância de gerações de vida parasitária e de vida livre. Muitos aspectos de sua biologia não estão esclarecidos, principalmente quanto à existência de machos de vida livre. **Objetivos.** Verificar quais fatores, ligados ao hospedeiro ou ao ambiente de cultivo, podem influenciar no desenvolvimento de adultos de vida livre no ciclo indireto do parasito. **Métodos.** Foram avaliados fatores ambientais, tais como: (a) cultivos em vermiculita e placas de ágar (Koga ágar) e; (b) temperatura de cultivo. Quanto aos fatores do hospedeiro, foram avaliados: (c) infecção experimental do parasito em camundongos suíços, ratos Wistar, gerbilos e ratos híbridos do cruzamento de ratos Wistar com ratos selvagens; (d) idade do hospedeiro; (e) quantidade de larvas inoculadas e; (f) sensibilização prévia às larvas por inoculação. Também foi avaliada a capacidade de manutenção do ciclo indireto do parasito por acompanhamento das culturas positivas para fêmeas de vida livre por períodos de tempo mais longos, além da clonagem de fêmeas de vida livre como objetivo de verificar se fêmeas partenogenéticas podem ou não manter o ciclo de vida livre. **Resultados e Conclusões.** (1) Machos de vida livre de primeira geração foram ausentes nas diferentes condições de cultura de fezes, mantidas por três dias, originadas dos hospedeiros utilizados. (2) A frequência de fêmeas de vida livre nos cultivos das amostras de fezes dos diversos hospedeiros foi baixa nas diferentes condições de cultivo, exceto quando fezes de ratos híbridos selvagens foram submetidas à redução da temperatura (6°C) antes da incubação a 28°C, quando a frequência daquelas fêmeas aumentou significativamente. (3) As fêmeas de vida livre de primeira geração foram capazes de manter o ciclo heterogônico do nematoide, inclusive com aparecimento de machos em gerações posteriores. (4) O ciclo de vida livre de *S. venezuelensis* foi mantido no laboratório, em repiques sucessivos, aparentemente por fêmeas de vida livre partenogenéticas.

**Palavras-chave:** *Strongyloides venezuelensis*; *Strongyloides*; cultura de fezes; vida livre; partenogênese.

## ABSTRACT

**Introduction.** *Strongyloides venezuelensis* (Brumpt, 1934) has been used as an experimental model of strongyloidiasis and its life cycle is complex and poorly known, with alternating generations of parasite and free-living stages. Many aspects of the parasite biology are not clear, especially regarding the existence of free-living males. **Objectives.** The goal of this study is to verify which factors, related to the host or to the culture environment, can influence the development of adults of free-living stages in the indirect cycle of the parasite. **Methods.** Environmental factors were evaluated, such as: (a) vermiculite cultures and agar plates (Koga agar) and; (b) culture temperature. Regarding host factors, we evaluated: (c) experimental infection of the parasite in Swiss mice, Wistar rats, gerbils and hybrid rats from the crossing of Wistar rats with wild rats; (d) host age; (e) amount of inoculated larvae and; (f) immunological sensibilization with larvae inoculation. The ability to maintain the indirect cycle of the parasite was also evaluated by monitoring the positive cultures for free-living females for longer periods, as well as the cloning of free-living females in order to verify whether parthenogenetic females may or may not maintain the free-living cycle. **Results and Conclusions.** (1) First-generation free-living males were absent in different fecal culture conditions, maintained for three days, from the hosts. (2) The frequency of free-living females in the faeces cultures from different hosts was low at different culture conditions, except when faeces from wild hybrid rats were first submitted to temperature reduction (6°C) before incubation at 28°C, when the frequency of those females increased significantly. (3) First-generation free-living females were able to maintain the heterogeneous cycle of the nematode, including males in later generations. (4) The free-living cycle of *S. venezuelensis* was maintained in the laboratory, in successive cultures, apparently by parthenogenetic free-living females.

**Keywords:** *Strongyloides venezuelensis*; *Strongyloides*; stool culture; free-living; parthenogenesis.

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E UNIDADES

*ad libitum* - à vontade

*apud* – citado por

BOD – *Biochemical Oxygen Demand* (Demanda Bioquímica de Oxigênio)

CEUA - Comitê de Ética na Utilização de Animais

CO<sub>2</sub> - dióxido de carbono

DPI - dias pós-infecção

dpc - dias pós-cultivo

dNTPs - Desoxirribonucleotídeos Fosfatados

FcR<sub>γ</sub> - Fc receptor gama

FcR<sub>ε</sub> - Fc receptor épsilon

g – grama

IC 95% - Intervalo de confiança de 95%

ICB – Instituto de Ciências Biológicas

IgE – Imunoglobulina E

IgG1 – Imunoglobulina G1

ILC2 - *Innate Lymphoid Cells type 2* (Célula linfoides da imunidade inata tipo 2)

IL-4 – Interleucina 4

IL-5 – Interleucina 5

IL-13 – Interleucina 13

IL-33 – Interleucina 33

KCl - Cloreto de Potássio

L1 – larvas rabditoides de primeiro estágio

L2 – larvas rabditoides de segundo estágio

L3 - larvas filarioides de terceiro estágio infectante

L4 – larvas de quarto estágio

mg - miligrama

MgCl<sub>2</sub> - Cloreto de Magnésio

mL - mililitro(s)

mm - milímetro(s)

mM - milimolar

mmol/L - milimol por litro

NaCl - Cloreto de Sódio

ng – nanograma

NGM - *Nematode Growth Media* (Meio para crescimento de nematoides)

N<sub>2(l)</sub> – Nitrogênio líquido

pb – pares de base

PBS – *Phosphate buffered saline* (Tampão fosfato salino)

PCR - *Polymerase Chain Reaction* (Reação em Cadeia da Polimerase)

pH - potencial hidrogeniônico

pM – picomolar

pmol/μL- picomol por microlitro

rpm – rotações por minuto

rRNA 28S - RNA ribossomal do gene 28S

spp. - espécies

SSU rDNA - *Small subunit* (Pequena subunidade do gene do rRNA)

TBE - tampão Tris-Borato-EDTA

Th2 - *T-cell helper 2* (Célula T colaboradora 2)

UFMG - Universidade Federal de Minas Gerais

UFES - Universidade Federal do Espírito Santo

U - Unidade Internacional

UV - Ultravioleta

μL - microlitro(s)

μm - micrômetro(s)

VL – Vida livre

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1.** Formas evolutivas de *Strongyloides stercoralis*. an= ânus; bo= boca; ca= cauda entalhada; cl= cloaca; ep= espículo; es= esôfago; in= intestino; ov= ovário; pg= primórdio genital; te= testículo; ut= útero divergente; vb= vestíbulo bucal curto; vu= vulva (copiado, com modificações, de Costa-Cruz, 2016).....**pag. 24**

**Figura 2.** Algumas formas evolutivas de *Strongyloides venezuelensis*. A-E, fêmea parasita. A= visão geral; B= vista ventral do estoma aberto; C= vista ventral do estoma fechado; D= cabeça em vista dorsal; E= cabeça em vista lateral; F= vista lateral da cauda do macho de vida livre; G= espículo direito e gubernáculo; H= fêmea de vida livre (copiado, de Little, 1966).....**pag. 26**

**Figura 3.** Relação filogenética molecular entre as espécies de *Strongyloides* inferido a partir do gene 28S rRNA (copiado de HINO et al., 2014).....**pag. 28**

**Figura 4.** Ciclo evolutivo de *Strongyloides venezuelensis* em roedor (Adaptado de PORTO et al., 2002).....**pag. 29**

**Figura 5.** Representação esquemática das configurações cromossômicas propostas para diferentes espécies de *Strongyloides*. (A) XX/XO determinação sexual. Autossomos (dois pares) estão em preto, os cromossomos X estão em cinza. (B) Nenhuma diferença cariotípica entre os sexos. (C) Diminuição da cromatina específica do sexo em machos. Em (B) e (C) as regiões que se propuseram derivar de um cromossomo X estão em cinza (copiado, com modificações, de Streit, 2008).....**pag. 37**

**Figura 6.** Representação esquemática do método de isolamento de ovos obtidos de culturas de manutenção, por micromanipulação manual, para a verificação da partenogênese de fêmeas de vida livre de *Strongyloides venezuelensis*.....**pag. 49**

**Figura 7.** Fêmea partenogenética parasita de *Strongyloides venezuelensis*. A- visão geral; B- terço posterior do corpo indicando posição da vulva; C- detalhe da vulva e ovo; D- detalhe da cauda.....**pag. 62**

**Figura 8.** Ovos de fêmeas de vida livre de *Strongyloides venezuelensis* em diferentes estágios de desenvolvimento. A- ovo antes da primeira divisão; B- ovo com dois blastômeros; C- ovo com visivelmente quatro blastômeros; D- ovo com múltiplos blastômeros; E- ovo morulado; F- ovo embrionado; G- ovo larvado; H- eclosão da larva.....**pag. 63**

**Figura 9.** Larva filarioide de *Strongyloides venezuelensis*. A- visão geral; B- detalhe do esôfago; C- detalhe da cauda com entalhe característico; D- detalhe ampliado da cauda (sem escala).....**pag. 64**

**Figura 10.** Fêmea de vida livre de *Strongyloides venezuelensis*. A- visão geral; B- detalhe do esôfago; C- detalhe da vulva e ovos; D- detalhe da cauda.....**pag. 65**

**Figura 11.** Macho de vida livre de *Strongyloides venezuelensis*. A- visão geral; B- detalhe do esôfago; C- vista lateral da extremidade posterior com detalhe dos espículos e do processo caudal afilado; D- vista ventral da extremidade posterior com detalhe da membrana ventral e das papilas caudais pedunculadas.....**pag. 66**

**Figura 12.** Fotografia do gel de agarose a 2% dos produtos amplificados pela *Touchdown PCR* com o uso dos *primers* F3 e B3 (Fernandéz-Soto et al., 2016) de DNA extraído de várias amostras contendo *Strongyloides venezuelensis*. Colunas 1 e 12: marcador de tamanho molecular 100 pb ladder (Life Technologies); coluna 2: controle negativo (sem DNA); coluna 3: controle positivo; colunas 4, 7 e 8: banda de amplificação de 215 pb a partir de amostras de DNA de *S. venezuelensis* de fezes submetidas ao tratamento em  $N_{2(l)}$ ; coluna 5: banda de amplificação de 215 pb a partir de amostras de DNA de *S. venezuelensis* de fezes submetidas ao tratamento em etanol e PBS; coluna 6: banda de amplificação de 215 pb a partir de amostras de DNA de *S. venezuelensis* de fezes submetidas ao tratamento em tampão ASL e  $N_{2(l)}$ ; coluna 9: banda de amplificação de 215 pb a partir de amostras de DNA de *S. venezuelensis* de fezes adicionadas de larvas L1 submetidas ao tratamento em  $N_{2(l)}$ ; colunas 10 e 11: banda de amplificação de 215 pb a partir de amostras de DNA de *S. venezuelensis* de sedimento do Baermann-Moraes contendo larvas L3.....**pag. 67**

**Figura 13.** Proposta para o ciclo de vida de *Strongyloides venezuelensis* (em condições laboratoriais).....**pag. 76**

## LISTA DE QUADROS E TABELAS

**Quadro 1.** Dados morfométricos de fêmeas parasitas, larvas L3 e machos e fêmeas de vida livre de *Strongyloides venezuelensis*, obtidos por três autores entre os anos de 1966 a 1994.....**pag. 26**

**Quadro 2.** Sequências oligonucleotídicas de *primers* obtidos no GenBank com número de acesso AJ417026, utilizados para detecção do DNA de *Strongyloides venezuelensis* nas amostras utilizadas, de acordo com protocolo empregado por Fernández-Soto e colaboradores (2016).....**pag. 52**

**Quadro 3.** Sequência de bases do DNA ribossômico de *Strongyloides venezuelensis* na qual estão inseridas as sequências dos *primers* (azul e vermelho) utilizadas para a *Touchdown PCR* (Número de acesso no GenBank: AJ417026).....**pag. 52**

**Tabela 1.** Culturas de fezes em vermiculita positivas para adultos de vida livre de *Strongyloides venezuelensis* de amostras provenientes de camundongos, gerbilos, ratos Wistar e ratos híbridos selvagens.....**pag. 56**

**Tabela 2.** Avaliação do efeito da idade do hospedeiro na frequência de adultos de vida livre em culturas de fezes em vermiculita de amostras de ratos Wistar infectados com 3000 larvas L3 de *Strongyloides venezuelensis*.....**pag. 57**

**Tabela 3.** Avaliação do efeito da dose de inoculação na frequência de adultos de vida livre em culturas de fezes em vermiculita de amostras de ratos Wistar, ratos híbridos selvagens e camundongos infectados com *Strongyloides venezuelensis*.....**pag. 57**

**Tabela 4.** Frequência de formas de vida livre em culturas de fezes em vermiculita de ratos Wistar que eliminaram uma infecção com 5, 30 ou 60 larvas L3 de *Strongyloides venezuelensis* (sensibilizados) e de ratos Wistar virgens, sendo que os dois grupos receberam uma dose desafio de 250 larvas L3 do parasito.....**pag. 58**

**Tabela 5.** Frequência de adultos de vida livre em culturas de fezes em vermiculita submetidas ao resfriamento a 6°C por 15 minutos antes da incubação a 28°C, provenientes de ratos Wistar, ratos híbridos selvagens e camundongos infectados com *Strongyloides venezuelensis*.....**pag. 59**

**Tabela 6.** Número de culturas positivas para cada forma evolutiva de *Strongyloides venezuelensis* observada a partir de um único ovo proveniente de fêmeas de vida livre. Foram considerados positivos os testes nos quais apareceram mais de duas larvas

L1/L2 ou L3 ou fêmeas de vida livre no terceiro dia de cultivo.  
 .....pag. 60

**Tabela 7.** Dados morfométricos de fêmeas partenogenéticas parasitas de *Strongyloides venezuelensis* recuperadas de gerbilo. Os valores apresentados em micrômetros representam a média e o desvio padrão, com IC 95% entre parênteses.....pag. 61

**Tabela 8.** Dados morfométricos dos ovos de *Strongyloides venezuelensis* obtidos de fêmeas partenogenéticas parasitas e de fêmeas de vida livre, ambos provenientes de culturas de fezes de ratos híbridos selvagens. Os valores apresentados em micrômetros representam a média e o desvio padrão, com IC 95% entre parênteses.....pag. 63

**Tabela 9.** Dados morfométricos de larvas filarioides (L3) de *Strongyloides venezuelensis* recuperadas de coproculturas de ratos híbridos selvagens. Os valores apresentados em micrômetros representam a média e o desvio padrão, com IC 95% entre parênteses.....pag. 64

**Tabela 10.** Dados morfométricos de fêmeas de vida livre de *Strongyloides venezuelensis* recuperadas de coproculturas de ratos híbridos selvagens. Os valores apresentados em micrômetros representam a média e o desvio padrão, com IC 95% entre parênteses.....pag. 65

**Tabela 11.** Dados morfométricos de machos de vida livre de *Strongyloides venezuelensis* recuperados de culturas de manutenção provenientes de ratos híbridos selvagens. Os valores apresentados em micrômetros representam a média e o desvio padrão, com IC 95% entre parênteses.....pag. 66



## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO/JUSTIFICATIVA.....	pag. 19
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	pag. 22
2.1. Caracterização morfológica das espécies do gênero <i>Strongyloides</i> .....	pag. 22
2.2. <i>Strongyloides venezuelensis</i> .....	pag. 24
2.2.1. Caracterização morfológica de <i>Strongyloides venezuelensis</i> .....	pag. 25
2.3. Caracterização molecular das espécies do gênero <i>Strongyloides</i> .....	pag. 27
2.4. Ciclo biológico de <i>Strongyloides venezuelensis</i> em roedores.....	pag. 28
2.5. Resposta imunológica a <i>Strongyloides venezuelensis</i> .....	pag. 31
2.6. Aspectos gerais do desenvolvimento de parasitos do gênero <i>Strongyloides</i> .....	pag. 32
2.7. Determinação dos ciclos de vida nas espécies do gênero <i>Strongyloides</i> .....	pag. 33
2.7.1. Fatores ambientais.....	pag. 34
2.7.2. Fatores genéticos do parasito.....	pag. 35
2.7.3. Fatores do hospedeiro.....	pag. 37
2.8. Modo de reprodução na geração de vida livre dos parasitos do gênero <i>Strongyloides</i> : partenogênese, pseudogamia ou reprodução sexuada?.....	pag. 38
3. OBJETIVOS.....	pag. 40
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	pag. 41
4.1. Animais utilizados nos experimentos.....	pag. 41
4.2. Parasito.....	pag. 41
4.3. Infecção com <i>Strongyloides venezuelensis</i> .....	pag. 42
4.3.1. Coleta das fezes.....	pag. 42
4.3.2. Cultivo das fezes.....	pag. 42
4.3.3. Exame das culturas.....	pag. 43

4.3.4. Inóculos das larvas.....	pag. 44
4.4. Delineamento experimental.....	pag. 44
SÉRIE EXPERIMENTAL A.....	pag. 45
4.4.1. Verificação da existência de machos de vida livre de <i>Strongyloides venezuelensis</i> em culturas de amostras de fezes de camundongos, gerbilos, ratos Wistar e ratos híbridos selvagens infectados com o parasito, cultivadas em vermiculita ou Koga ágar para verificar a influência da espécie do hospedeiro na diferenciação daquelas formas de vida livre.....	pag. 45
4.4.2. Verificação da influência da idade do hospedeiro, da quantidade de larvas no inóculo, da infecção prévia do hospedeiro e da redução da temperatura na fase inicial da coprocultura na evolução das formas de vida livre.....	pag. 45
SÉRIE EXPERIMENTAL B.....	pag. 47
4.4.3. Análise das culturas positivas para fêmeas de vida livre durante períodos mais longos de incubação, para verificar a manutenção do ciclo de vida livre.....	pag. 47
4.4.4. Verificação da partenogênese das fêmeas de vida livre de <i>Strongyloides venezuelensis</i> .....	pag. 48
4.4.5. Evolução da geração de vida livre.....	pag. 49
4.4.6. Caracterização morfométrica e molecular de <i>Strongyloides venezuelensis</i> .....	pag. 50
4.4.6.1. Caracterização morfométrica das formas evolutivas de <i>Strongyloides venezuelensis</i> .....	pag. 50
4.4.6.2. Caracterização molecular de <i>Strongyloides venezuelensis</i> .....	pag. 51
4.5. Análise dos resultados.....	pag. 53
4.6. Aspectos éticos.....	pag. 54
5. RESULTADOS.....	pag. 55
SÉRIE EXPERIMENTAL A.....	pag. 55

5.1. Verificação da existência de machos de vida livre de <i>Strongyloides venezuelensis</i> em culturas de amostras de fezes de camundongos, gerbilos, ratos Wistar e ratos híbridos selvagens infectados com o parasito, cultivadas em vermiculita ou Koga ágar para verificar a influência da espécie do hospedeiro na diferenciação daquelas formas de vida livre.....	pag. 55
5.2. Influência da idade do hospedeiro, da dose do inóculo, da exposição prévia às larvas e da redução da temperatura das coproculturas antes da incubação a 28°C na evolução das formas de vida livre do parasito, especialmente no aparecimento de machos de vida livre.....	pag. 56
SÉRIE EXPERIMENTAL B.....	pag. 59
5.3. Análise das culturas positivas para fêmeas de vida livre durante períodos mais longos de incubação, para verificar a manutenção do ciclo de vida livre.....	pag. 59
5.4. Verificação da partenogênese das fêmeas de vida livre de <i>Strongyloides venezuelensis</i> .....	pag. 60
5.5. Evolução da geração de vida livre.....	pag. 60
5.6. Caracterização morfométrica e molecular de <i>Strongyloides venezuelensis</i> .....	pag. 61
5.6.1. Caracterização morfométrica das formas evolutivas de <i>Strongyloides venezuelensis</i> .....	pag. 61
5.6.2. Caracterização molecular de <i>Strongyloides venezuelensis</i> .....	pag. 67
6. DISCUSSÃO.....	pag. 68
7. CONCLUSÕES.....	pag. 77
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	pag. 78
ANEXO.....	pag. 86

## 1. INTRODUÇÃO/JUSTIFICATIVA

Nematoides do gênero *Strongyloides* pertencem a classe Chromadorea, ordem Rhabditida e família Strongyloididae (BLAXTER et al., 1998). Neste gênero estão incluídas cerca de 60 espécies, que parasitam principalmente mamíferos, mas também aves, répteis e anfíbios (VINEY e KIKUCHI, 2017). Todas estas espécies têm um ciclo de vida complexo, apresentando fêmeas partenogenéticas parasitas que eliminam ovos ou larvas nas fezes do hospedeiro. Os ovos e larvas no meio externo podem evoluir de duas formas: realizam o ciclo direto, homogônico ou partenogenético, originando larvas filarioides infectantes (L3) ou o ciclo indireto, heterogônico ou de vida livre, diferenciando em machos e fêmeas de vida livre, que se reproduzem sexuadamente no meio externo. As larvas originadas da reprodução sexuada se diferenciam em L3 infectantes. A reprodução partenogenética é mitótica e dá origem a larvas que podem evoluir para L3 infectantes (formam fêmeas partenogenéticas), machos e fêmeas de vida livre. A evolução para uma das três formas possíveis é influenciada por fatores do hospedeiro (resposta imunológica) e fatores ambientais como temperatura e pH (VINEY e LOK, 2007).

A estrongiloidíase humana é uma infecção parasitária causada pelo nematoide *Strongyloides stercoralis* Bavay, 1876, embora também sejam conhecidas infecções esporádicas em humanos com a espécie *Strongyloides fuelleborni* Von Linstow, 1905 (ASHFORD et al., 1992; GROVE, 1996). É uma doença negligenciada que, geralmente é assintomática em indivíduos imunocompetentes, mas, em casos de imunossupressão, pode ocasionar infecção disseminada ou hiperinfecção que pode levar a óbito (KEISER e NUTMAN, 2004; BENINCASA et al., 2007; OLSEN et al., 2009; MARQUES et al., 2010).

*Strongyloides venezuelensis* Brumpt, 1934, parasito de roedores, tem sido frequentemente utilizado como modelo experimental para estudos de alguns aspectos da infecção humana por *S. stercoralis* (MACHADO et al., 2003), para entendimento da biologia do gênero *Strongyloides* (BAEK et al., 1998), e inclusive como fonte de antígenos para o desenvolvimento de novos métodos

no imunodiagnóstico da estrogiloidíase humana (CUNHA et al., 2017). *Rattus norvegicus* é o hospedeiro natural de *S. venezuelensis* (NAKAI e AMARANTE, 2001; MARUYAMA et al., 2006), mas este nematoide também infecta facilmente gerbilos (*Meriones unguiculatus*) (BAEK et al., 2002), camundongos (*Mus musculus*) (SATO e TOMA, 1990; NAKAI e AMARANTE, 2001) e saguis (MELO et al., 2012).

Para a manutenção de *S. venezuelensis* em laboratório, os animais são infectados por inoculação subcutânea de larvas L3. Após a maturação das fêmeas, as fezes com os ovos do parasito podem ser mantidas em ambiente úmido ou cultivadas em meios adequados, em temperaturas em torno de 25°C a 30°C, liberando larvas que podem evoluir para as formas de vida livre e gerar larvas filarioides infectantes. Os estágios de vida livre crescem nas fezes e larvas L3 são vistas, tipicamente migrando para fora da massa fecal. Esse desenvolvimento ocorre, aproximadamente, em 48 horas (VINEY e KIKUCHI, 2017). As condições de cultivo *in vitro* podem afetar a morfologia das larvas L3 de *S. venezuelensis*, sem, no entanto, alterar sua infectividade (ISLAM et al., 1999).

Embora *S. venezuelensis* seja um modelo experimental amplamente utilizado em laboratório, alguns aspectos de sua biologia permanecem mal conhecidos. Estudos têm demonstrado uma frequência muito baixa de encontro de adultos de vida livre de *S. venezuelensis*, destacando inclusive a falta de observação de machos em experimentos realizados sob diferentes condições de cultivo (WERTHEIM e LENGY, 1964; HASEGAWA et al., 1988; TAIRA et al., 1994; PEGORARO, 1999; NAGAYASU et al., 2013; HINO et al., 2014).

Pelo fato do ciclo de vida de *S. venezuelensis* ser pouco conhecido e por haver muitas questões a serem esclarecidas, o objetivo do estudo foi analisar a evolução das larvas eclodidas de ovos de *S. venezuelensis*, cultivados em condições controladas, para verificar quais fatores, ligados ao hospedeiro ou ao ambiente de cultivo, podem influenciar o desenvolvimento das formas de vida livre do parasito, especialmente no aparecimento de machos. Para esse fim foram utilizados quatro diferentes hospedeiros (camundongos suíços, ratos Wistar, gerbilos e ratos híbridos do cruzamento de ratos Wistar com ratos

selvagens), cultivos em vermiculita e em ágar, com variações na idade dos hospedeiros, na existência ou não de infecção prévia, na dose do inóculo e na temperatura de cultivo.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. Caracterização morfológica das espécies do gênero *Strongyloides*

Muitas espécies do gênero *Strongyloides* foram identificadas apenas com base nos hospedeiros, devido à dificuldade para estabelecer características morfológicas diferenciais entre as diversas espécies (LITTLE, 1966). No entanto, alguns autores descreveram características morfológicas para *Strongyloides* spp. que servem como base para um detalhamento do gênero (MORAES, 1948; LITTLE, 1966; SPEARE, 1989; GROVE 1996; VINEY e LOK, 2015; COSTA-CRUZ, 2016). Nas descrições destes autores, destacam-se as seguintes formas:

**a) Fêmeas partenogenéticas parasitas:** correspondem à única fase parasitária. Vivem nas criptas da mucosa do terço anterior do intestino delgado. Comprimento médio entre 2 a 4 mm na maioria das espécies. Largura média de 75 µm. Corpo delgado, cutícula finamente estriada. Boca alongada. Esôfago filariforme. Vulva localizada no terço posterior do corpo. Aparelho reprodutor anfídelfo. Ovidutos com ovos enfileirados em diferentes estágios de maturação. Cauda curta, abruptamente afilada. Não apresentam receptáculo seminal;

**b) Ovos:** são elípticos, com paredes extremamente finas. Tamanho médio de 40 a 70 µm de comprimento com largura média com cerca da metade do comprimento. Os ovos das fêmeas parasitas e de vida livre são idênticos na aparência com tamanho ligeiramente variável;

**c) Larvas rabditoides de primeiro estágio (L1):** comprimento médio entre 150 a 390 µm por 14 a 20 µm de largura. Vestíbulo bucal curto. Esôfago rabditiforme (tipo rabditoide), com corpo, istmo e bulbo distintos e evidentes que ocupam um terço do comprimento total da larva, estruturalmente semelhante ao do adulto de vida livre. Não existem diferenças morfológicas que podem ser detectadas entre larvas de primeiro estágio desenvolvidas a partir de ovos de fêmeas parasitas ou de vida livre;

**d) Larvas rabditoides de segundo estágio (L2):** são morfológicamente semelhantes as L1, logo após a muda. A morfologia do esôfago é alterada,

torna-se mais alongado, porém ainda é rabditiforme, com as divisões do corpo, istmo e bulbo menos evidenciadas;

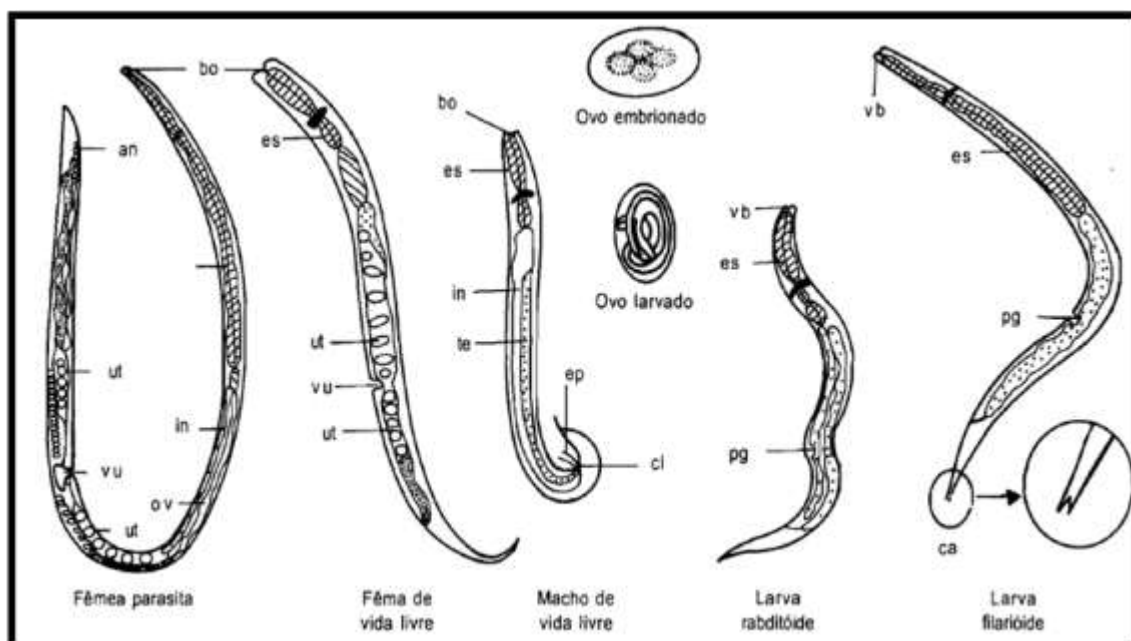
**e) Larvas filarioides de terceiro estágio (L3):** correspondem às formas infectantes. São finas e alongadas. Medem entre 400 a 700  $\mu\text{m}$  de comprimento por 12 a 20  $\mu\text{m}$  de largura. Cutícula finamente estriada. Cavidade bucal pequena. Esôfago longo, do tipo filariforme como o da fêmea partenogenética parasita, com comprimento de cerca de 40% do corpo. Intestino longo e estreito terminando em uma abertura anal. Cauda afilada com entalhe característico;

**f) Fêmeas de vida livre:** medem aproximadamente 1,5 mm de comprimento por 85  $\mu\text{m}$  de largura. Aspecto fusiforme. Cutícula fina com estrias transversais. Esôfago curto, do tipo rabditoide com uma pequena porção muscular, sendo a musculatura do corpo e a do bulbo mais robustas do que a do istmo. Anel nervoso na altura do istmo. Bulbo com aparato valvular bem desenvolvido. Intestino simples terminando em ânus na extremidade posterior. Cauda afilada. Vulva situada na região mediana do corpo. Aparelho reprodutor anfidelfo;

**g) Machos de vida livre:** ligeiramente menores do que as fêmeas, com comprimento médio entre 0,7 a 1,2 mm por 55  $\mu\text{m}$  de largura. Aspecto fusiforme. Esôfago rabditoide prolongando-se com intestino simples, terminando em cloaca. Sistema reprodutor composto por testículos, vesícula seminal, canal deferente, canal ejaculador e um pequeno par de espículos copulatórios, que se deslocam sustentados pelo gubernáculo. O testículo despenda logo atrás do esôfago, estendendo-se até aproximadamente o meio do corpo. Cauda recurvada ventralmente. Presença de seis pares de papilas genitais e uma única papila pré-cloacal.

A Figura 1 mostra as diferentes formas evolutivas de *S. stercoralis*, cuja morfologia geral é comum para a maioria das espécies.





**Figura 1.** Formas evolutivas de *Strongyloides stercoralis*. an= ânus; bo= boca; ca= cauda entalhada; cl= cloaca; ep= espículo; es= esôfago; in= intestino; ov= ovário; pg= primórdio genital; te= testículo; ut= útero divergente; vb= vestibulo bucal curto; vu= vulva (copiado, com modificações, de Costa-Cruz, 2016).

## 2.2. *Strongyloides venezuelensis*

A descrição de *S. venezuelensis* foi inicialmente realizada por Brumpt (1934), em ratos selvagens na Venezuela, por meio de uma infecção mista de *S. venezuelensis* e *Strongyloides ratti* Sandground, 1925. Esta descrição foi breve e incompleta, de modo que a espécie foi redescrita de *R. norvegicus* nos Estados Unidos por Little (1966), incluindo desta vez, uma geração de vida livre. Segundo este autor, o isolamento de *S. venezuelensis* foi realizado por infecção com uma única larva em ratos Wistar, estabelecendo assim uma linhagem pura.

Amplamente distribuído em regiões quentes do mundo, *S. venezuelensis* também foi relatado em Israel, Brasil e Japão (WERTHEIM e LENGY, 1964; ARAÚJO, 1967; HASEGAWA et al., 1988). No entanto, existem poucas informações sobre a prevalência ou intensidade de infecções selvagens, sendo que a maioria dos relatos de infecção são informais (VINEY e KIKUCHI, 2017).

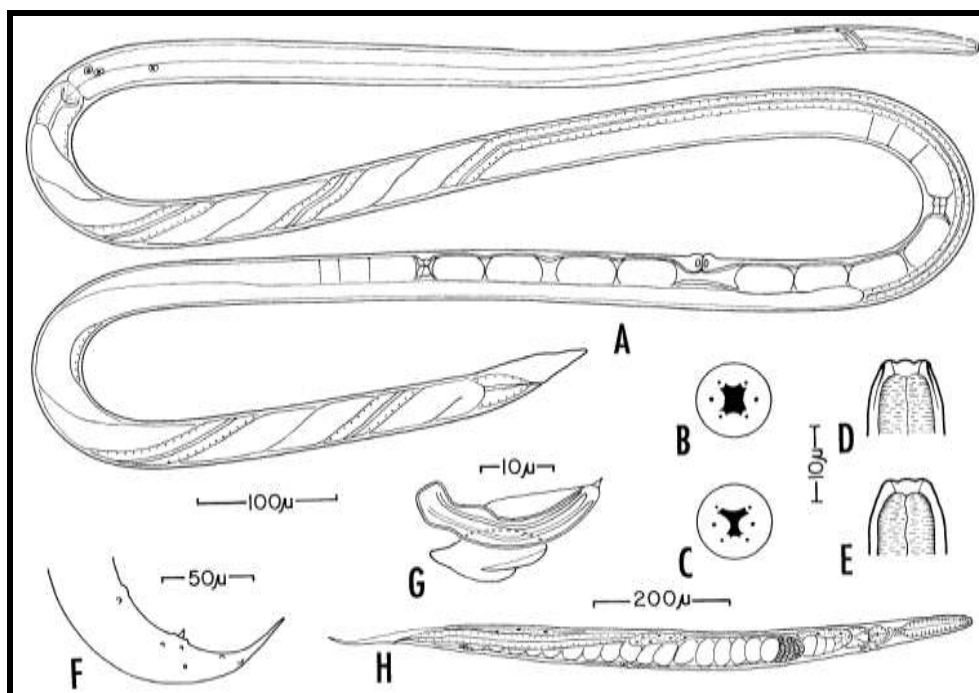
### 2.2.1. Caracterização morfológica de *Strongyloides venezuelensis*

Little (1966) destacou algumas características morfológicas para *S. venezuelensis* (Figura 2). Para as fêmeas parasitas encontradas no intestino de *R. norvegicus* ficou evidenciada a presença de estoma ornamentado. Ambos os ovários espiralados em torno do intestino. Oito a doze ovos no útero, ainda em clivagem inicial, quando presentes nas fezes. Cauda curta, cônica. Fêmeas de vida livre sem constrições no corpo; lábios da vulva não proeminentes. Ovos em linha única no útero. Macho de vida livre com papilas pós-anais subdorsais sempre ligeiramente posteriores às subventrais; espículos acentuadamente inclinados, membrana ventral proeminente.

Duas importantes características que diferenciam *S. venezuelensis* de *S. ratti* são o formato dos ovários nas fêmeas parasitas e a forma evolutiva eliminada nas fezes dos hospedeiros. Para *S. venezuelensis* os ovários das fêmeas são espiralados, e são encontrados ovos em estágios iniciais de clivagem nas fezes dos hospedeiros enquanto que, para *S. ratti*, os ovários são retilíneos e podem ser encontrados ovos ou larvas L1 nas fezes recém-eliminadas (LITTLE, 1966).

Embora Little (1966) tenha descrito machos de vida livre de *S. venezuelensis*, inclusive com mensurações e com uma ligeira caracterização morfológica desta forma evolutiva, nenhum outro estudo verificou a presença de machos de vida livre em culturas de hospedeiros infectados com *S. venezuelensis*.

Além de Little (1966), poucos estudos avaliaram aspectos morfológicos de *S. venezuelensis*. No Quadro 1, estão resumidos alguns dados morfométricos das formas evolutivas de *S. venezuelensis*, feitas por três autores que fizeram a morfometria do parasito.



**Figura 2.** Algumas formas evolutivas de *Strongyloides venezuelensis*. A-E, fêmea parasita. A= visão geral; B= vista ventral do estoma aberto; C= vista ventral do estoma fechado; D= cabeça em vista dorsal; E= cabeça em vista lateral; F= vista lateral da cauda do macho de vida livre; G= espículo direito e gubernáculo; H= fêmea de vida livre (copiado, de Little, 1966).

**Quadro 1.** Dados morfométricos de fêmeas parasitas, larvas L3 e machos e fêmeas de vida livre de *Strongyloides venezuelensis*, obtidos por três autores entre os anos de 1966 a 1994.

Formas evolutivas	Amplitude das medidas (µm)			Referências
	Comprimento	Largura	Esôfago	
Fêmeas parasitas	2000-3200	33-41	600-780	Little, 1966
	2652-3087	29-35	748-843	Wertheim, 1970
	2035-2959	29-41	667-775	Taira et al., 1994
L3 infectantes	470-640	16-19	220-290	Little, 1966
	505-639	15-18	218-272	Wertheim, 1970
	482-573	14-17	214-262	Taira et al., 1994
Fêmeas vida livre	810-1200	40-70	125-155	Little, 1966
Machos vida livre	800-930	40-50	110-125	Little, 1966

### 2.3. Caracterização molecular das espécies do gênero *Strongyloides*

A variabilidade genética dos helmintos pode, atualmente, ser determinada por análises moleculares, permitindo o conhecimento da filogenia das diferentes espécies de nematoides.

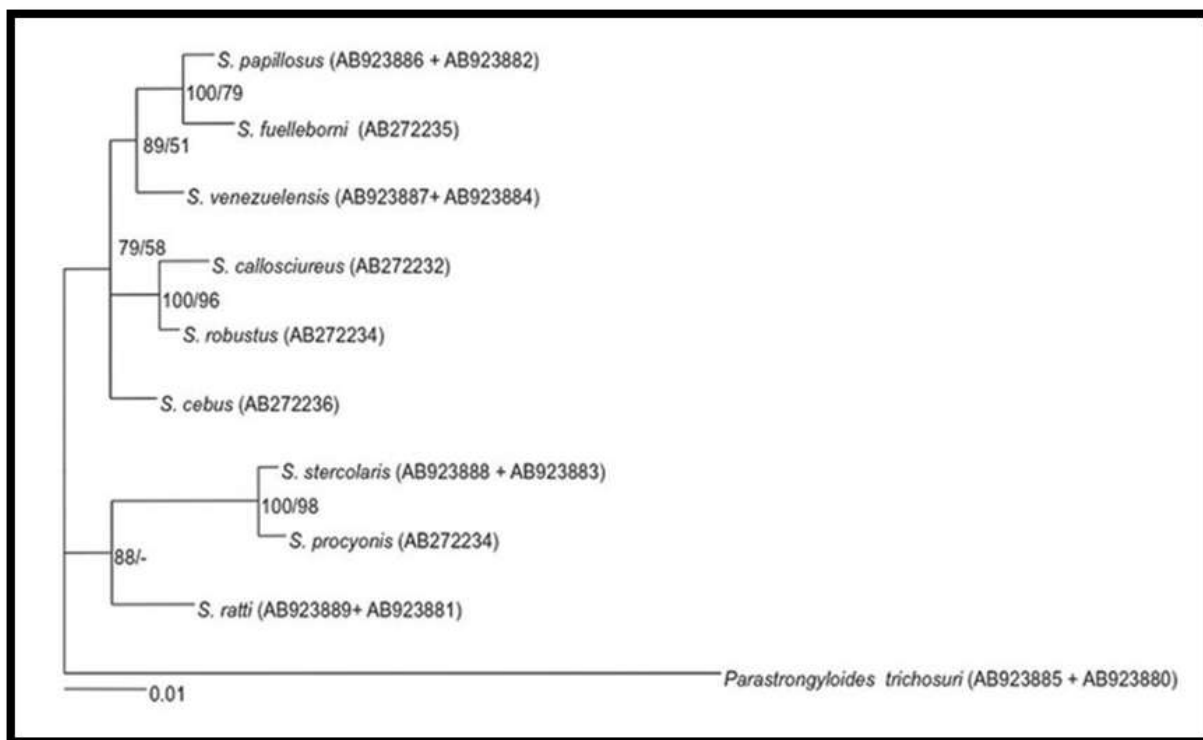
Em estudo filogenético molecular, Dorris e colaboradores (2002) avaliaram dez amostras de *Strongyloides* de uma ampla gama de hospedeiros, utilizando o segmento correspondente à pequena subunidade do gene do rRNA (SSU rDNA), amplificado pela reação em cadeia da polimerase (PCR) com os iniciadores universais SSUA/SSU22R. As sequências obtidas para *Strongyloides* foram muito semelhantes entre si, e o gênero foi dividido em dois clados: (1) um contendo *Strongyloides* sp. isolado de serpente, *S. stercoralis* e *Strongyloides fuelleborni*, e (2) o outro contendo *S. ratti*, *Strongyloides suis*, *S. venezuelensis*, *Strongyloides cebus*, *S. fuelleborni kelleyi* e *Strongyloides papillosus*. Além disso, os autores argumentaram que, apesar de habitarem os mesmos hospedeiros e de estarem no mesmo clado, *S. ratti* e *S. venezuelensis* são significativamente separados geneticamente, principalmente através de mudanças apomórficas (quando uma característica mais recente foi derivada de uma característica primitiva) na sequência SSU de *S. venezuelensis*.

Hino e colaboradores (2014), ao realizarem a análise filogenética do gene do rRNA 28S de *S. venezuelensis*, sugeriram que esta espécie está distantemente relacionada com *S. ratti* e mais estreitamente relacionada com *S. papillosus*, um parasito de ruminantes, e com *S. fuelleborni*, parasito de primatas (Figura 3).

Recentemente, Hunt e colaboradores (2016), ao estudarem a base genômica do parasitismo em *Strongyloides* spp., verificaram que as famílias dos genes que codificam a astacina (metalopectidase com papel na migração tecidual de larvas infectantes) e SCP/TAPS (moléculas imunomoduladoras), se destacam entre os genes associados ao parasitismo, um aspecto comum às diferentes espécies do gênero.

A análise transcriptômica de Hunt e colaboradores (2018), para quatro espécies de *Strongyloides* permitiu sugerir que, algumas famílias de genes

codificadores de proteínas têm papéis importantes na evolução do parasitismo a nível de gênero, subclado e espécie. Pode-se citar, por exemplo, a regulação positiva dos genes que codificam as proteínas do citocromo P450 em fêmeas parasitas de *S. venezuelensis*, e sua ausência nas outras espécies estudadas (*S. papillosus*, *S. stercoralis* e *S. rattii*).

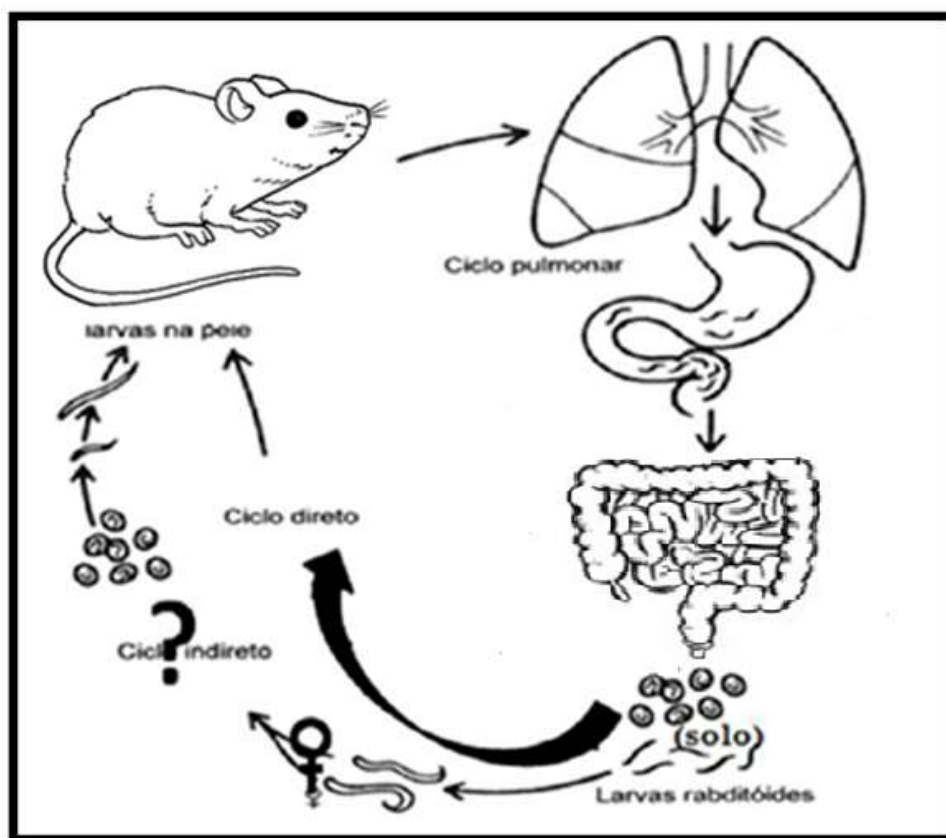


**Figura 3.** Relação filogenética molecular entre as espécies de *Strongyloides* inferido a partir do gene 28S rRNA (copiado de HINO et al., 2014).

#### 2.4. Ciclo biológico de *Strongyloides venezuelensis* em roedores

O ciclo de vida de *S. venezuelensis* naturalmente se inicia pela penetração ativa de larvas filarioides infectantes (L3), na pele ou mucosa do hospedeiro. As L3 contam com uma metaloprotease, enzima específica de larva infectante, que auxilia na penetração (MARUYAMA et al., 2006). As infecções experimentais em roedores geralmente ocorrem por via percutânea ou pela inoculação subcutânea de larvas L3. Logo após penetrarem na pele, as larvas migram através da musculatura ou caem na corrente sanguínea, até atingirem os pulmões. As larvas são detectadas nos pulmões entre um a três dias após inoculação subcutânea. Em seguida, deixam os pulmões, e migram gradualmente pelas vias aéreas superiores passando pela faringe, esôfago e

estômago até atingir o intestino delgado onde atingem a maturidade como fêmeas partenogenéticas parasitas, iniciando a postura de ovos (Figura 4) (SATO e TOMA, 1990; TAKAMURE, 1995).



**Figura 4.** Ciclo evolutivo de *Strongyloides venezuelensis* em roedor (Adaptado de PORTO et al., 2002).

Fêmeas imaturas podem ser encontradas no intestino a partir do segundo dia após a infecção (SATO e TOMA, 1990). As fêmeas partenogenéticas parasitas de *S. venezuelensis* secretam moléculas de adesão existentes na boca, que apresentam um importante papel na invasão, adesão e estabelecimento na mucosa intestinal. Essas moléculas começam a ser secretadas quando as larvas saem dos pulmões (MARUYAMA e NAWA, 1997; MARUYAMA et al., 2006).

As larvas se transformam em fêmeas parasitas, após seu estabelecimento no intestino, entre o 5º e 6º dia após infecção, completando seu desenvolvimento e amadurecimento sexual, o que reflete no início da postura dos ovos. Entre o 6º e 8º dia pós-infecção (DPI) em camundongos, é possível observar o pico de

eliminação de ovos, mas na maioria das vezes, o pico ocorre no 7º DPI (SATO e TOMA, 1990; NAKAI e AMARANTE, 2001; AMARANTE e OLIVEIRA-SEQUEIRA, 2002). Em ratos, o pico de eliminação de ovos é encontrado entre o 8º e o 11º DPI (NAKAI e AMARANTE, 2001).

Maior quantidade de fêmeas é encontrada nas porções iniciais do intestino delgado, correspondendo ao duodeno e jejuno (NAKAI e AMARANTE, 2001). A eliminação das fêmeas parasitas em camundongos, se completa entre 12 e 14 dias após a infecção (SATO e TOMA, 1990; AMARANTE e OLIVEIRA-SEQUEIRA, 2002). Em ratos, normalmente há auto cura após 24 a 42 dias após a infecção, no entanto, em alguns casos, esta pode ocorrer mais tardiamente entre 70 a 79 dias após a infecção (TAMURA, 1993; NAKAI e AMARANTE, 2001; BAEK et al., 2003). Essa eliminação espontânea em ratos e camundongos ocorre devido a um mecanismo de resistência natural dos hospedeiros a esse parasito. Já os gerbilos, mantêm infecções persistentes por longos períodos (até 570 dias), devido a defeitos funcionais nas células efetoras regulatórias (HORII et al., 1993; KHAN et al., 1993; BAEK et al., 2002).

Os ovos, produzidos partenogeneticamente, são as formas evolutivas eliminadas nas fezes de roedores infectados com *S. venezuelensis* (BAEK et al., 2002; HINO et al., 2014). No meio ambiente, dão origem a larvas rabditoides de primeiro estágio (L1). Estas se alimentam de bactérias, e podem seguir dois ciclos: direto ou indireto. No ciclo direto, em condições ambientais favoráveis, as larvas L1 evoluem para larvas rabditoides de segundo estágio (L2) e posteriormente, para larvas L3 infectantes. Finalmente, o ciclo se completa quando larvas L3 infectantes entram em contato com um novo hospedeiro (VINEY e LOK, 2015; COSTA-CRUZ, 2016). No ciclo indireto, as larvas L1 presentes no ambiente sofrem quatro mudas, formando adultos de vida livre. De forma geral, para *Strongyloides* spp. o acasalamento entre machos e fêmeas de vida livre pode dar origem preferencialmente a larvas L3 infectantes ou, a uma nova geração de vida livre, o que é menos comum (YAMADA et al., 1991; VINEY e LOK 2007).

Apesar de ter sido descrito o ciclo indireto de evolução de *S. venezuelensis*, existem ainda dúvidas, especialmente em relação ao desenvolvimento de machos de vida livre.

Um dos aspectos particulares do ciclo biológico de *S. venezuelensis* é a raridade com que as larvas eclodidas dos ovos se diferenciam em fêmeas e machos de vida livre (HASEGAWA et al., 1988). No meio externo os ovos de *S. venezuelensis* dão origem a larvas que, na sua maioria, evoluem para as formas filarioides infectantes. A evolução de larvas para machos e fêmeas de vida livre não é frequente. Hino e colaboradores (2014) examinaram 162 culturas de fezes de ratos Wistar infectados experimentalmente com *S. venezuelensis* em placas de ágar e observaram adultos de vida livre em apenas 19 (11,7%). Segundo os autores, foram observadas somente fêmeas de vida livre, não tendo sido observados machos em nenhuma das culturas. Os autores comentam essa peculiaridade do ciclo de vida livre do parasito, ressaltando a diferença com *S. rattii* em que machos e fêmeas de vida livre são frequentemente observados, inclusive com fertilização e eliminação de ovos viáveis (SAKAMOTO e UGA, 2013). Os autores admitem que a raridade de machos ou a ausência deles no experimento relatado possa estar relacionada ao fato de observações serem feitas com culturas de ovos originados de fêmeas partenogênicas de cepa mantida por longo tempo em laboratório; mas também admitem ser possível que na natureza a diferenciação de machos possa ocorrer, embora uma observação feita com cultivo de ovos obtidos de parasito recentemente isolado de roedores selvagens não mostrou desenvolvimento de machos (HASEGAWA et al., 1988).

## **2.5. Resposta imunológica a *Strongyloides venezuelensis***

A resposta imunológica desenvolvida contra *S. venezuelensis*, atua nos locais de maior contato com os tecidos do hospedeiro: pulmões e mucosa intestinal. A primeira resposta ao parasito é detectada nos pulmões onde antígenos das larvas (quitina de revestimento) ativam receptores no epitélio alveolar (pneumócitos do tipo II) que libera IL-33 a qual ativa linfócitos da imunidade inata do grupo 2 (ILC2). Estes ativados liberam IL-5 e IL-13 responsáveis por



induzir hipersecreção de muco e eosinofilia local. As principais alterações observadas nos pulmões são uma inflamação pulmonar com grave infiltração de eosinófilos acompanhada de hiperplasia de células caliciformes do epitélio brônquico (YASUDA et al., 2014).

Quando *S. venezuelensis* se estabelece no intestino delgado do hospedeiro, há uma resposta imunológica predominantemente regulada por citocinas Th-2, incluindo IL-4, IL-5 e IL-13, responsáveis pela eosinofilia, mastocitose e hiperplasia de células caliciformes que ocorre nas mucosas. A expulsão das fêmeas parasitas é dependente da ativação dos mastócitos via FcR $\gamma$  e FcR $\epsilon$  pelos anticorpos IgG1 e IgE, que estão aumentados no sangue, sendo essa ativação indispensável para a resistência (SASAKI et al., 2005; SCHILTER et al., 2010; EL-MALKY et al., 2013; MATSUMOTO et al., 2013; YASUDA et al., 2014).

Ratos e camundongos, após uma infecção primária são mais resistentes a reinfecção. Os efeitos desta resistência que se manifestam sobre as fêmeas parasitas na infecção secundária concentram-se na redução acentuada do seu número, tamanho e fecundidade, além de danos aos órgãos reprodutivos e sua rápida expulsão (SATO e TOMA, 1990; AMARANTE e OLIVEIRA-SEQUEIRA, 2002; BAEK et al., 2003).

## **2.6. Aspectos gerais do desenvolvimento de parasitos do gênero *Strongyloides***

Todas as espécies de *Strongyloides* compartilham os ciclos direto e indireto. Contudo, são encontradas diferenças específicas no número de gerações produzidas pelos adultos de vida livre. Na maioria das espécies, observa-se apenas uma geração de vida livre, como em *S. stercoralis* e *S. ratti* (YAMADA et al., 1991; VINEY, 1999; VINEY e LOK, 2015). No entanto, em *Strongyloides planiceps*, parasito de felinos, foram encontradas nove gerações de vida livre (YAMADA et al., 1991).

Beach (1936) constatou três gerações de vida livre consecutivas para *Strongyloides simiae* (parasito de macacos) e sugeriu que, em ótimas

condições de cultura, esta espécie poderia se propagar indefinidamente como forma de vida livre.

Já no estudo realizado por Augustine (1940), foram encontradas consecutivas gerações de vida livre em *S. simiae*, *S. fuelleborni* e em *Strongyloides* sp. isolado do primata *Cebus apela* (14, 11 e cinco gerações, respectivamente), mas não foram encontradas em um isolado de um cão. Em todas as três espécies foram encontrados machos de vida livre, mas em quantidade insuficiente para manter em cultura. Neste caso, os machos provenientes de fêmeas parasitas foram utilizados para obter consecutivas gerações de fêmeas de vida livre.

Em suas pesquisas com *S. fuelleborni*, Premvati (1958b) observou apenas uma geração de vida livre, mesmo em condições de cultivo consideradas ideais. Em contraste, Beg (1968) também estudando *S. fuelleborni*, identificou um grande número de adultos de vida livre de segunda geração de ambos os sexos, porém não houve quantificação de machos e fêmeas. Curiosamente, Hansen e colaboradores (1969) observaram a ocorrência de fêmeas de vida livre, mas não de machos, na progênie da geração de vida livre de *S. fuelleborni*, sendo que estas fêmeas reproduziram apenas quando os machos de primeira geração estavam presentes.

## **2.7. Determinação dos ciclos de vida nas espécies do gênero *Strongyloides***

A proporção de machos e fêmeas de vida livre e de larvas infectantes na progênie da fêmea partenogenética parasita das espécies do gênero *Strongyloides* é altamente variável e imprevisível (TRANTAPHYLLOU e MONCOL, 1977). Vários estudos têm demonstrado que fatores ambientais, a natureza genética do parasito e o estado imunológico do hospedeiro podem influenciar no desenvolvimento para um dos dois ciclos.

### 2.7.1. Fatores ambientais

A temperatura exerce um efeito significativo na proporção de formas de vida livre e larvas infectantes em coproculturas. Nwaorgu (1983) observou que o número de machos de vida livre de *S. papillosus* recuperados das culturas incubadas a 20°C e 30°C era constante. No entanto, as fêmeas eram mais numerosas em culturas mantidas a 30°C e larvas infectantes a 20°C.

Hansen e colaboradores (1969) relataram que fêmeas de vida livre de *S. fuelleborni* raramente se desenvolvem em temperaturas inferiores a 20°C. Corroborando esse resultado, Viney (1996) relatou que larvas de *S. rattii* se desenvolvem em fêmeas de vida livre em ambientes com temperatura mais alta (30°C), enquanto o ciclo direto foi favorecido em temperatura mais baixa (13°C). Da mesma forma, Hino e colaboradores (2014) observaram fêmeas de vida livre em amostra de fezes de ratos infectados com *S. venezuelensis* incubadas a 25°C e 30°C, não sendo observadas em amostras incubadas a 19°C. Contrariamente a estas observações, Gugosyan e colaboradores (2018) verificaram que larvas de *Strongyloides westeri* se desenvolveram, na maioria das vezes, em adultos de vida livre em temperatura de 20°C, enquanto que larvas filarioides predominantemente se desenvolveram em temperatura em torno de 25-30°C.

Ao investigar como as larvas de *S. rattii* se adaptam e sobrevivem em condições de temperatura inadequadas, Sakamoto e Uga (2013) concluíram que apenas um minuto de estimulação em baixa temperatura (4 ou 10°C) foi suficiente para estimular larvas para o desenvolvimento direto. Além disso, os autores relataram que mesmo se as larvas começarem seu desenvolvimento depois de terem sido transferidas para uma condição adequada (25°C), estas memorizam a estimulação sob baixas temperaturas a qual foram submetidas anteriormente, o que direciona o desenvolvimento de modo que elas possam infectar imediatamente o hospedeiro.

Por outro lado, o pH e a disponibilidade de nutrientes no meio de cultivo também podem influenciar na direção dos ciclos. Um pH inferior a 5,9 ou superior a 7,2 favorece a diferenciação de larvas L3 infectantes, enquanto um pH próximo a neutralidade favorece o desenvolvimento de formas de vida livre

em *Strongyloides ransomi* (MONCOL e TRIANTAPHYLLOU, 1978). Quanto à disponibilidade de nutrientes, acredita-se que os estágios sexuais sejam mais exigentes do ponto de vista metabólico (GALLIARD, 1967, apud HANSEN e colaboradores, 1969). Uma alimentação rica em matéria orgânica leva ao desenvolvimento indireto (SHIWAKU et al., 1988; PEGORARO, 1999).

Em contrapartida, as observações de Minematsu e colaboradores (1989) mostraram que a presença de ácidos graxos em culturas de fezes de *S. ratti* promove o desenvolvimento direto, enquanto Taylor e Weinstein (1990) verificaram que concentrações mais elevadas de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) levam ao desenvolvimento indireto para a mesma espécie. Hansen e colaboradores (1969) concluíram em estudos com *S. fuelleborni*, que o meio de cultura aeróbio propicia o desenvolvimento do ciclo direto, enquanto que as formas de vida livre são mais prevalentes em meios semiaeróbios.

#### 2.7.2. Fatores genéticos do parasito

A teoria que vigorou por maior tempo sobre herança genética nas gerações parasitas e de vida livre de *Strongyloides* spp. se fundamentou nas observações de Chang e Graham (1957, apud STREIT, 2008). Eles propuseram que as fêmeas parasitas e de vida livre de *S. papillosus* diferiam em ploidia, de modo que as fêmeas de vida livre eram fêmeas diploides e as parasitas, triploides. De acordo com esses autores, as fêmeas parasitas produziam três tipos diferentes de ovos: triploides (3n) que se desenvolviam em L3 infectantes, diploides (2n) que se desenvolviam em fêmeas de vida livre e haploides (n) que originavam machos de vida livre. A triploidia na progênie da geração de vida livre era restaurada pela fertilização de ovos diploides com um espermatozoide haploide. No entanto, observações citológicas de outros autores para outras espécies, concluíram que todas as fêmeas (partenogenéticas parasitas e de vida livre) têm o mesmo número de cromossomos (ZAFFAGNINI, 1973; TRIANTAPHYLLOU e MONCOL, 1977; ALBERTSON et al., 1979; HAMMOND e ROBINSON, 1994). Além disso, estudos genéticos demonstraram que a progênie de vida livre de *S. papillosus* e *S. ratti* são diploides (VINEY et al., 1993; VINEY, 1994; EBERHARDT et al., 2007). Da mesma forma, Harvey e

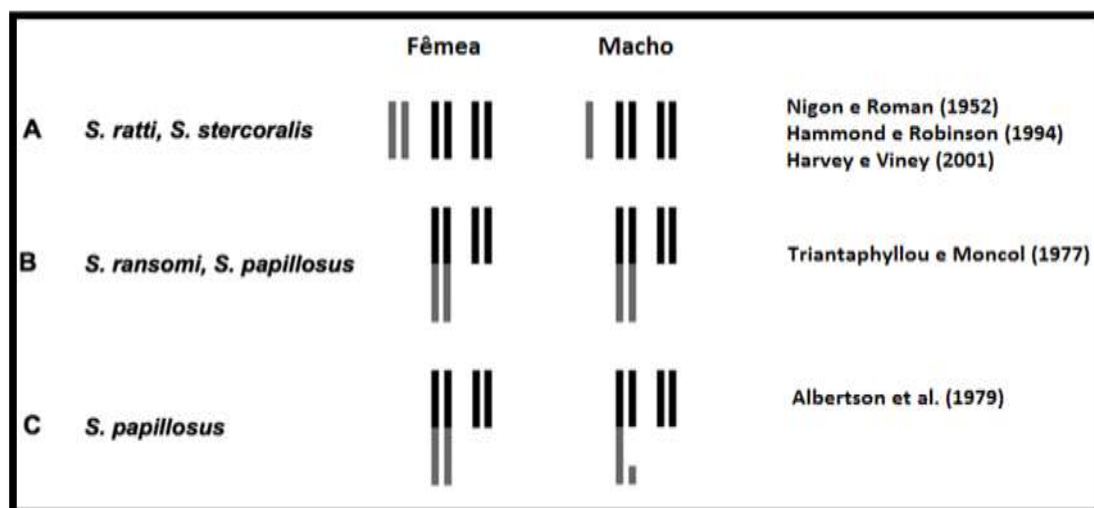
Viney (2001) concluíram que todas as formas evolutivas de *S. rattii*, exceto os machos de vida livre, são diploides.

Apesar de ser um aspecto interessante, pouco se conhece sobre o mecanismo pelo qual as fêmeas partenogenéticas de *Strongyloides* spp. produzem adultos de vida livre de ambos os sexos. Embora certas condições ambientais e fatores do hospedeiro possam influenciar, pelo menos em parte, na determinação da sexualidade, algumas espécies de *Strongyloides* possuem um cromossomo sexual (Fig. 5). As análises citológicas de *S. rattii* (BOLLA e ROBERTS, 1968) e de *S. stercoralis* (HAMMOND e ROBINSON, 1994) indicaram que os machos possuem cinco cromossomos (determinação sexual XX/XO, Fig. 5A) enquanto as fêmeas têm seis cromossomos (2 cromossomos sexuais X e 4 autossomos). Posteriormente, Harvey e Viney (2001) também concluíram para *S. rattii* que a determinação sexual XX/XO é genética.

Nas análises citológicas de Triantaphyllou e Moncol (1977), não foram encontradas diferenças no número de cromossomos para machos e fêmeas de vida livre de *S. papillosus* e *S. ransomi*. Curiosamente, ambas as espécies têm apenas dois pares de cromossomos (em oposição aos três pares em *S. stercoralis* e *S. rattii*) sendo um par consideravelmente maior do que o outro (Fig. 5B). Esses autores suspeitaram que o cromossomo mais longo é o resultado de um evento de fusão cromossômica, no qual o cromossomo X combina com um dos autossomos. Em contraste, Albertson e colaboradores (1979) verificaram uma diferença cromossômica entre machos e fêmeas de *S. papillosus*, que se relaciona com um evento de diminuição de cromatina, específica do sexo masculino. De acordo com esses autores, uma porção interna de um dos cromossomos maiores homólogos é eliminada durante a mitose em oócitos que se desenvolverão em machos. Consequentemente, os machos possuem um cromossomo grande, três cromossomos de tamanho médio e um cromossomo pequeno (Fig. 5C), com o cromossomo pequeno e um dos cromossomos de tamanho médio sendo os restos do cromossomo grande diminuído.

Nemetschke e colaboradores (2010) demonstraram geneticamente que *S. papillosus* emprega diminuição da cromatina específica para o sexo masculino,

bem como fusão do cromossomo X com um autossomo, confirmando as observações citológicas de Triantaphyllou e Moncol (1977) e Albertson e colaboradores (1979). Além disso, os autores demonstraram que a região que sofre diminuição é homóloga ao cromossomo X de *S. rattii*. Dessa forma, a diminuição da cromatina serve para restaurar funcionalmente um sistema de determinação do sexo XX / XO.



**Figura 5.** Representação esquemática das configurações cromossômicas propostas para diferentes espécies de *Strongyloides*. (A) XX/XO determinação sexual. Autossomos (dois pares) estão em preto, os cromossomos X estão em cinza. (B) Nenhuma diferença cariotípica entre os sexos. (C) Diminuição da cromatina específica do sexo em machos. Em (B) e (C) as regiões que se propuseram derivar de um cromossomo X estão em cinza (copiado, com modificações, de Streit, 2008).

### 2.7.3. Fatores do hospedeiro

O estado imunológico do hospedeiro pode influenciar a determinação sexual da progênie da fêmea parasita. Gemmill e colaboradores (1997) e Harvey e colaboradores (2000), mediante a manipulação experimental do estado imunológico do hospedeiro utilizando mutantes hipotímicos, ratos submetidos ao tratamento com corticosteroides, irradiação gama e exposição prévia a *S. rattii*, verificaram que as larvas de hospedeiros que apresentam resposta imunológica adquirida são mais propensas a se tornarem adultos de vida livre. Os pesquisadores argumentam que a geração sexual facultativa é mantida como uma estratégia para combater as respostas imunológicas específicas do genótipo.

Moncol e Triantaphyllou (1978) atribuíram que a maior proporção de machos de vida livre encontrados a partir da sétima semana de infecção em fezes de suínos infectados com *S. ransomi*, foi devido ao efeito do aumento da imunidade do hospedeiro e ao envelhecimento fisiológico das fêmeas parasitas. Os autores admitem que, a imunidade do hospedeiro e a idade das fêmeas parasitas são interdependentes, mas seus efeitos não podem ser facilmente separados.

A importância da imunidade na determinação do ciclo de vida livre também foi confirmada por Pegoraro (1999), que verificou que o número médio de fêmeas de vida livre de *S. venezuelensis* aumenta à medida que as infecções vão se tornando mais antigas. Além do efeito da idade da infecção, a autora observou que infecções em ratos mais velhos (60 dias) e a maior intensidade de infecção (doses infecciosas com 3.500 L3) também favorecem o aparecimento de fêmeas de vida livre.

Finalmente, a infecção em um hospedeiro experimental atípico mostrou alterar a proporção de formas sexuais. A infecção de ovelhas com *S. papillosus* apresenta um desenvolvimento misto, mas com menor proporção de adultos de vida livre, com machos extremamente raros. No entanto, com a transferência experimental do parasito para coelhos, o desenvolvimento tornou-se quase totalmente indireto e o número de machos foi igual ou maior do que o de fêmeas (BRUMPT, 1921, apud SANDGROUND, 1926; BASIR, 1950; TRIANTAPHYLLOU e MONCOL, 1977).

## **2.8. Modo de reprodução na geração de vida livre dos parasitos do gênero *Strongyloides*: partenogênese, pseudogamia ou reprodução sexuada?**

Embora atualmente seja aceito que a geração de vida livre é constituída por machos e fêmeas que se reproduzem sexualmente, dois pesquisadores já sugeriram a ocorrência da reprodução partenogenética: 1- Sandground (1926) não conseguiu isolar machos e observar esperma no trato reprodutivo das fêmeas em coproculturas de *S. stercoralis* que produziram progênie. Logo, concluiu que a partenogênese ocorreu quando os machos estavam ausentes.

No entanto, estas observações foram ocasionais; 2- Zaffagnini (1973) encontrou poucos machos (proporção que variou de 0 a 20,5%) e não observou esperma no trato reprodutivo de fêmeas de *S. papillosus*. Sendo assim, com base em suas observações citológicas, ele propôs que a reprodução de *S. papillosus* se dá por partenogênese. Contudo, até o momento, não existem estudos de nenhuma espécie de *Strongyloides* mostrando que as fêmeas de vida livre sabidamente virgens produzam progênes viáveis.

Outros modos de reprodução são possíveis na geração de vida livre de *Strongyloides* spp., os quais levam a alguns desentendimentos quanto ao papel dos machos. Já foi demonstrado por processos citológicos que, em diferentes espécies de *Strongyloides*, pode ocorrer pseudogamia (partenogênese dependente de esperma) em *S. ratti* (BOLLA e ROBERTS, 1968), em *S. papillosus* (TRANTAPHYLLOU e MONCOL, 1977) e em *S. stercoralis* (HAMMOND e ROBINSON, 1994). Em contraste, alguns trabalhos que investigaram a herança de marcadores genéticos moleculares em *S. ratti* (VINEY et al., 1993; VINEY, 1994), em *S. papillosus* (EBERHARDT et al., 2007) e em *S. stercoralis* (JALETA et al. 2017) verificaram que os machos podem contribuir com material genético para a próxima geração. A razão pelo qual os estudos citológicos e genéticos geraram resultados contraditórios, continua sem resposta.



### 3. OBJETIVOS

Tendo em vista que muitos aspectos biológicos de *S. venezuelensis* ainda permanecem obscuros, especialmente no que se refere ao ciclo indireto do parasito, realizamos a presente investigação com o objetivo de:

- 3.1. Verificar a existência de machos de vida livre de *S. venezuelensis* em culturas de amostras de fezes de camundongos, gerbilos, ratos Wistar e ratos híbridos selvagens infectados com o parasito, cultivadas em vermiculita ou Koga ágar, para verificar a influência da espécie do hospedeiro na diferenciação desta forma evolutiva;
- 3.2. Verificar a influência da idade do hospedeiro, da dose do inóculo, da exposição prévia às larvas e da redução da temperatura das coproculturas antes da incubação a 28°C na evolução das formas de vida livre do parasito, especialmente no aparecimento de machos de vida livre;
- 3.3. Acompanhar culturas positivas para fêmeas de vida livre por períodos de tempo mais longos, inclusive repicando essas culturas com a finalidade de verificar a manutenção de formas de vida livre;
- 3.4. Clonar fêmeas de vida livre no intuito de verificar se o ciclo de vida livre é mantido por fêmeas partenogenéticas.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. Animais utilizados nos experimentos

Foram utilizados camundongos suíços (*M. musculus*) com aproximadamente 40 dias de vida; ratos Wistar (*R. norvegicus*) com aproximadamente 30, 60 e 120 dias de vida, originados do Biotério do Centro de Ciências da Saúde. Os gerbilos (*M. unguiculatus*) utilizados tinham aproximadamente 90 dias de vida e foram provenientes de matrizes adquiridas comercialmente e mantidas no Laboratório de Experimentação *in vivo*. Todos os animais foram mantidos em gaiolas de plástico com tampas metálicas e alimentados com ração comercial e água *ad libitum*. Animais machos foram utilizados devido à influência hormonal na resistência ao parasito (RIVERO et al., 2002a e 2002b).

Ratos híbridos, com aproximadamente 30 dias de vida, provenientes do cruzamento de ratos selvagens e Wistar (*R. norvegicus*) foram gentilmente cedidos pelo professor Luiz Carlos Schenberg do Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas. Aqui, eles serão considerados como “ratos híbridos selvagens”.

### 4.2. Parasito

*Strongyloides venezuelensis* pertence a uma cepa mantida, desde 1987, no Laboratório de Taxonomia e Biologia de Invertebrados do Departamento de Parasitologia do ICB/UFMG, com passagens sucessivas em camundongos da linhagem AKR/J (MARTINS et al., 2009). Esta cepa foi gentilmente cedida pelo professor Alan Lane de Melo e tem sido mantida, desde 2010, no laboratório de Parasitologia do Departamento de Patologia da UFES, em gerbilos infectados subcutaneamente com 2000 larvas filarioides (L3). Gerbilos são utilizados para manutenção de *S. venezuelensis* pelo fato desse roedor ser muito susceptível ao nematoide, mantendo infecções por até 570 dias (BAEK et al. 2002).

### **4.3. Infecção com *Strongyloides venezuelensis***

Os animais foram infectados com larvas L3 de *S. venezuelensis* obtidas pelo cultivo das fezes dos gerbilos, contendo os ovos do parasito, em vermiculita. O número de larvas infectantes está indicado em cada experimento. Para manutenção do parasito o laboratório utiliza inóculos com 1000 a 2000 larvas.

#### **4.3.1. Coleta das fezes**

Os animais infectados foram colocados em gaiolas com fundo anticoprofágico e forradas com papel umedecido por um período de 24 horas. Em seguida, as fezes foram coletadas para contagem dos ovos e realização das coproculturas. Não foram padronizados os dias para as coletas dos ovos nos quatro hospedeiros. A coleta foi realizada sempre que possível, respeitando o início, meio e término da infecção, com preferência para os dias nos quais a eliminação de ovos era maior. Como a duração do ciclo de vida de *S. venezuelensis* é menor em camundongos, nestes hospedeiros foi feita a coleta de ovos do sexto ao 16º dia após a infecção.

A quantidade de ovos de *S. venezuelensis* eliminada pelas fêmeas partenogénéticas presentes no intestino, foi avaliada pela contagem nas fezes. As amostras de fezes de roedores infectados com *S. venezuelensis* foram coletadas, pesadas e preparadas para contagem do número de ovos de acordo com a técnica de Gordon e Whitlock (1939), modificada.

#### **4.3.2. Cultivo das fezes**

Foram utilizados dois meios de cultivo para os ovos: vermiculita e Koga ágar. Os cultivos foram realizados da seguinte forma:

**(a) Cultivo em vermiculita (segundo Ribeiro e colaboradores, 2014):** as fezes dos animais infectados (2 a 3 g) foram homogeneizadas e misturadas a 5 ou 6 g de vermiculita (fezes/vermiculita na proporção de 1:2), em frasco de plástico de 250 mL. O frasco foi coberto com papel alumínio perfurado, para entrada de

ar e incubado em estufa tipo BOD (Demanda Bioquímica de Oxigênio) a 28°C. Verificou-se diariamente a homogeneidade e o grau de umidade das culturas, para promover condições adequadas para a eclosão das larvas.

**(b) Cultivo em placa de ágar** (Arakaki, 1988, modificado por Koga e colaboradores, 1991): 1-2 g de fezes dos roedores infectados com *S. venezuelensis* foram homogeneizadas e em seguida colocadas sobre placa de ágar (ágar 1,5%, extrato de carne 0,5%, peptona 1,0% e NaCl 0,5%). As culturas foram mantidas a 28°C, temperatura esta, próxima daquela em que houve maior diferenciação de vermes adultos no experimento relatado por Hino e colaboradores (2014).

#### 4.3.3. Exame das culturas

**(a) Coproculturas em vermiculita:** após a incubação das coproculturas, realizou-se a técnica de Baermann modificada por Moraes (1948) para isolar e concentrar as formas evolutivas que foram desenvolvidas. Para a realização desta técnica foi adicionada água aquecida a 45°C em um funil de vidro com mangueira de silicone vedada por pinça de Mohr, sobre um suporte de madeira. A coprocultura foi colocada sobre uma gaze dobrada em quatro, formando uma pequena trouxa. Esta foi suavemente pressionada sobre um papel, achatando-se a base com o objetivo de aumentar a superfície de contato com a água. Em seguida, a trouxa era colocada sobre a superfície da água sem provocar sua imersão. Dessa forma, eram formadas duas regiões com temperaturas distintas: a água a 45°C e a coprocultura à temperatura ambiente. Após 60 minutos, a trouxa foi retirada da água, levemente pressionada contra a parede do funil, e descartada. O líquido presente no funil foi coletado em tubos cônicos e centrifugados a 1.500 rpm durante um minuto. O sobrenadante foi descartado e o sedimento recolhido analisado ao microscópio óptico com objetiva de 4x para a quantificação das larvas e posterior inoculação nos animais.

**(b) Coproculturas em ágar:** o ágar da placa de Koga foi picotado com uma espátula, e em seguida colocado sobre a gaze dobrada, formando a trouxa

como descrito para as culturas em vermiculita e também submetidas ao método de Baermann-Moraes. A tampa e as bordas da placa foram lavadas com água destilada para recolher as formas de vida livre que porventura tenham migrado para as paredes da placa. O líquido foi coletado em tubo cônico e centrifugado.

Foi feita análise microscópica do sedimento de ambas as culturas em microscópio óptico. Foram contados os números de adultos de vida livre quando observados.

As coproculturas foram avaliadas a partir do 3º dia pós-cultivo (dpc) até o 5º dpc, se estendendo até o 7º ou 10º dia em alguns experimentos.

#### **4.3.4. Inóculos das larvas**

Larvas L3 recolhidas do Baermann-Moraes eram contadas e ajustadas na concentração adequada para inóculo que era feito em volume de 500 µL em ratos e gerbilos. Para as inoculações em camundongos, as larvas foram ajustadas em volume de no máximo 200 µL. A inoculação era sempre subcutânea, na região inguinal. As quantidades de larvas inoculadas estão indicadas em cada experimento.

#### **4.4. Delineamento experimental**

Para atingir os objetivos propostos os experimentos foram divididos em duas séries: na Série Experimental A, foram realizados experimentos para verificar a existência de machos de vida livre de *S. venezuelensis* e os fatores que podem influenciar no seu desenvolvimento; na Série Experimental B, foram realizados experimentos para elucidar aspectos biológicos do ciclo de vida livre de *S. venezuelensis*, com o intuito de verificar seu tempo de duração e, se fêmeas partenogênicas podem ou não manter o ciclo de vida livre, além da caracterização morfométrica e molecular de *S. venezuelensis*.

## SÉRIE EXPERIMENTAL A

### **4.4.1. Verificação da existência de machos de vida livre de *Strongyloides venezuelensis* em culturas de amostras de fezes de camundongos, gerbilos, ratos Wistar e ratos híbridos selvagens infectados com o parasito, cultivadas em vermiculita ou Koga ágar para verificar a influência da espécie do hospedeiro na diferenciação daquelas formas de vida livre**

Para atingir esse objetivo, camundongos e ratos (Wistar e híbridos selvagens) foram inoculados (no mínimo dois animais por espécie). Quando utilizados mais de dois animais em cada grupo os inóculos foram feitos em cada animal em dias diferentes, para que pudéssemos acompanhar detalhadamente as culturas. Como na literatura existe uma grande variação no número de larvas L3 nos inóculos para ratos, camundongos e gerbilos, utilizamos doses diferentes (ver adiante), nos preocupando com a instalação de uma infecção na qual ocorresse uma boa eliminação de ovos.

Os gerbilos avaliados neste experimento são os mesmos animais que utilizamos para manutenção da cepa em nosso laboratório.

As fezes dos animais foram cultivadas em vermiculita ou Koga ágar, como descrito anteriormente. As análises das culturas foram feitas a partir de três dias após o cultivo, pela técnica de Baermann-Moraes. Foi feita uma cuidadosa análise morfológica para identificar os machos de vida livre que eram quantificados, quando observados.

### **4.4.2. Verificação da influência da idade do hospedeiro, da quantidade de larvas no inóculo, da infecção prévia do hospedeiro e da redução da temperatura na fase inicial da coprocultura na evolução das formas de vida livre**

#### ***(a) Verificação da influência da idade do hospedeiro***

Para verificar a influência da idade foram utilizados três grupos de ratos Wistar: **(I)** 25 a 30 dias de vida; **(II)** 60 a 70 dias de vida; **(III)** 120 dias de vida. Os

animais de cada grupo foram infectados com 3.000 larvas L3 de *S. venezuelensis*. Os exames das culturas foram feitos a partir de três dias após o cultivo.

**(b) Verificação da influência da quantidade de larvas no inóculo**

Para verificar a influência do inóculo na diferenciação das formas de vida livre foram utilizados ratos (Wistar e híbridos selvagens) e camundongos inoculados com diferentes doses de L3.

Para camundongos, foram utilizadas doses com 200, 400, 600 e 800 L3. Para ratos Wistar, foram utilizadas doses com 3.000, 5.000 e 15.000 L3. Para ratos híbridos selvagens foram utilizadas doses com 500, 1.000, 1.500 L3.

**(c) Verificação da influência da infecção prévia do hospedeiro**

Para verificar o efeito da exposição prévia a larvas L3, três ratos Wistar com 24 dias de vida foram inoculados com 5, 30 ou 60 L3. Para confirmar a infecção foi feita a pesquisa quantitativa de ovos nas fezes nos dias 6, 9, 15 e 23 após a infecção. No 27° e 28° DPI, os três ratos foram tratados com doses de 0,11 mL de suspensão de Tiabendazol a 17,6% peso/volume, por gavagem para eliminar qualquer parasito remanescente. A eliminação do parasito foi confirmada pela parada da eliminação de ovos o que ocorreu em torno do 30° DPI. Foi utilizado como controle um rato de mesma idade que não foi previamente exposto a larvas de *S. venezuelensis*.

A reinfecção foi realizada 35 dias após a primo-infecção quando todos os animais não eliminavam ovos. Todos os animais foram inoculados com uma dose desafio de 250 larvas L3, a mesma dose utilizada por Gemmill e colaboradores (1997) em experimento semelhante com *S. rattii*. As fezes foram coletadas e cultivadas a partir do 6° DPI até o 40° DPI com intervalos de no máximo quatro dias. As coproculturas foram examinadas a partir do 3° dia após o início da cultura.

**(d) Verificação da influência da redução da temperatura na fase inicial da coprocultura**

Para verificar a influência da redução da temperatura na fase inicial da coprocultura foram utilizadas amostras de camundongos, ratos Wistar e ratos híbridos selvagens.

Para cada amostra, foram realizadas duas culturas em vermiculita. Uma das culturas foi diretamente incubada em estufa a 28°C, e a outra foi colocada em geladeira com temperatura média de 6°C por 15 minutos. Após esse tempo, a cultura foi retirada da geladeira e incubada em estufa a 28°C por 3 a 5 dias. Este experimento foi realizado com base no trabalho de Sakamoto e Uga (2013) que relataram que ovos colhidos de ratos infectados com *S. ratti* mostravam variação na evolução do ciclo quando se variava a temperatura da incubação das coproculturas, mesmo em um curto período de tempo.

Em todos os experimentos indicados nos itens de **(a)** a **(d)** as culturas foram cuidadosamente examinadas para identificação de machos de vida livre, que, quando detectados, foram quantificados.

## **SÉRIE EXPERIMENTAL B**

### **4.4.3. Análise das culturas positivas para fêmeas de vida livre durante períodos mais longos de incubação, para verificar a manutenção do ciclo de vida livre**

Quando as culturas eram positivas para fêmeas de vida livre de *S. venezuelensis*, elas eram novamente incubadas e posteriormente analisadas para verificar a presença de formas evolutivas indicando progressão do ciclo. Essa reincubação foi repetida até oito vezes.

A reincubação era feita recolhendo-se a trouxa do Baermann-Moraes e recolocando-a sem desmontá-la no frasco que continha a cultura em vermiculita, o qual era mantido nas mesmas condições de umidade e temperatura. A leitura da reincubação era feita 24 horas depois submetendo-se a trouxinha a um novo exame por Baermann-Moraes. Terminado o exame a trouxinha era novamente incubada e mantida nas mesmas condições de temperatura e umidade e novo exame era realizado 24 horas depois.



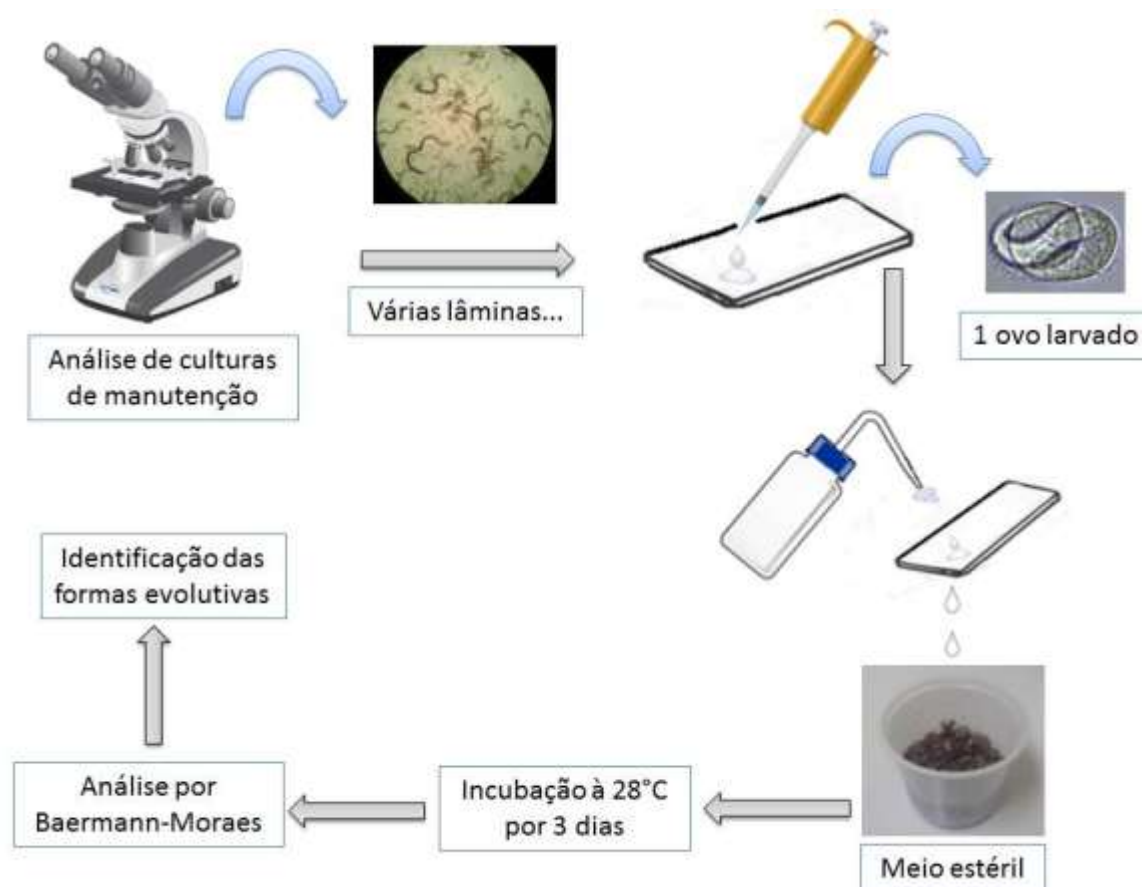
#### **4.4.4. Verificação da partenogênese das fêmeas de vida livre de *Strongyloides venezuelensis***

Para verificar a participação de fêmeas partenogenéticas no ciclo de vida livre de *S. venezuelensis*, foram utilizados ovos de fêmeas de vida livre provenientes de culturas de manutenção, desenvolvidas a partir de amostras de ratos híbridos selvagens. Entende-se por culturas de manutenção, aquelas que, após desenvolvimento de fêmeas de vida livre de primeira geração e após reincubações, deram origem a novas gerações de adultos de vida livre. Estes adultos de vida livre foram mantidos por repiques, sempre que necessário em novo meio com vermiculita, nas mesmas condições de umidade e temperatura.

As culturas dos ovos obtidos de fêmeas de vida livre foram realizadas em meio natural estéril obtido a partir de fezes de roedores sadios (ratos ou gerbilos), misturadas com vermiculita (na proporção 1:1) e esterilizadas em autoclave por 20 minutos a 121°C. As culturas foram realizadas em recipientes de plástico de 50 mL, contendo aproximadamente 7 g do meio estéril.

O isolamento dos ovos das fêmeas de vida livre foi feito em lâminas por micromanipulação manual utilizando pipeta automática com ponteira de 200 µL. No ato da micromanipulação os ovos eliminados pelas fêmeas eram cuidadosamente separados das demais formas evolutivas presentes no sedimento. Para facilitar a manipulação, os ovos eram colocados em uma gota de água em lâminas com a finalidade de que os mesmos se espalhassem para facilitar a aspiração de um único ovo que estivesse larvado. Uma vez aspirado um único ovo larvado, o aspirado era colocado em uma das bordas de uma lâmina limpa de modo que se pudesse verificar ao microscópio a presença do ovo aspirado. Em seguida, esta lâmina era cuidadosamente inclinada e lavada com água destilada sobre o frasco de cultura contendo o meio previamente umedecido. Logo após, verificava-se em microscópio a borda da lâmina que continha o ovo, para garantir que este tivesse sido corretamente carregado para o meio de cultivo. O frasco de cultivo era coberto com papel alumínio perfurado e incubado em estufa tipo BOD a 28°C por três dias. Após o período de incubação a cultura era examinada pela técnica de Baermann-Moraes para identificação de formas evolutivas de vida livre do nematoide (Figura 6). Desse

modo, garantimos que a cultura tinha uma única larva e que, portanto, se outras formas evolutivas aparecessem elas eram provenientes de uma única fêmea partenogenética originada desta larva.



**Figura 6.** Representação esquemática do método de isolamento de ovos obtidos de culturas de manutenção, por micromanipulação manual, para a verificação da partenogênese de fêmeas de vida livre de *Strongyloides venezuelensis*.

Os testes foram considerados negativos quando não foram encontradas nenhuma forma evolutiva ou, apenas uma larva L3. Por outro lado, os testes foram considerados positivos quando duas ou mais larvas L1/L2 ou L3, ou uma fêmea de vida livre com sua progênie foram encontradas.

#### 4.4.5. Evolução da geração de vida livre

Para elucidar aspectos da biologia de *S. venezuelensis*, foram realizados experimentos para verificar a evolução da geração de vida livre.

Eventualmente, para verificar o tempo necessário para o aparecimento de formas de vida livre após o cultivo das fezes dos hospedeiros, algumas culturas obtidas de ratos híbridos selvagens foram examinadas com dois dias de cultivo.

Para verificar o tempo necessário para eclosão de larvas rabditoides dos ovos de fêmeas de vida livre, algumas fêmeas foram colocadas em uma pequena gota de água enquanto aguardava-se a postura dos ovos. Logo após a postura, a lâmina era inspecionada a cada 15-20 minutos aproximadamente, tendo-se o cuidado de manter a umidade adequada.

Para verificar o tempo necessário para o desenvolvimento de larvas eclodidas dos ovos de fêmeas de vida livre, alguns ovos foram isolados em lâmina por micromanipulação manual, cultivados em meio estéril e incubados por 24 horas. Após esse período realizou-se o exame da cultura pela técnica de Baermann-Moraes.

#### **4.4.6. Caracterização morfométrica e molecular de *Strongyloides venezuelensis***

Para confirmar que a espécie do parasito utilizada nos experimentos era *S. venezuelensis*, foi realizada a caracterização morfométrica e molecular da cepa mantida em nosso laboratório.

##### ***4.4.6.1. Caracterização morfométrica das formas evolutivas de *Strongyloides venezuelensis****

Para esse experimento as coletas dos ovos e a incubação em vermiculita foram feitas conforme descrita nos itens 4.3.1. e 4.3.2.(a). As medidas dos ovos foram obtidas em diferentes estágios de desenvolvimento. Foram mensurados ovos de fêmeas parasitas obtidos diretamente das fezes do hospedeiro.

Para a coleta de larvas filarioides L3 foram feitas coproculturas de fezes de ratos híbridos selvagens, incubadas por aproximadamente 72 horas.

Para a coleta de machos, fêmeas e ovos das fêmeas de vida livre foram utilizadas culturas de manutenção do ciclo de vida livre do parasito provenientes de fezes de ratos híbridos selvagens.

Para a coleta de fêmeas partenogenéticas parasitas, um gerbilo foi sacrificado com injeção letal de Ketamina/Xilazina (120 mg/kg + 16 mg/kg) por via intraperitoneal. Todo o intestino delgado foi retirado e cortado longitudinalmente, colocado sobre uma gaze dentro de um béquer contendo solução salina (0,9% NaCl), e incubado em banho-maria por 4h a 37°C para migração de fêmeas da mucosa intestinal para a solução. Após este período o material depositado no fundo do béquer foi concentrado por centrifugação, o sobrenadante descartado e o sedimento fixado em formol 10%.

Todas as formas evolutivas de *S. venezuelensis* obtidas como descrito nos parágrafos anteriores, foram fotografadas com câmera Leica ICC50 HD Digital, com 3.1 megapixels de resolução, acoplada ao microscópio óptico Leica DM500, e mensuradas com o software TSView 6.1 (Tucsen Imaging Technology Co. Limited). Todas as mensurações foram apresentadas como média e desvio padrão e, com intervalo de confiança de 95% (IC 95%).

#### 4.4.6.2. Caracterização molecular de *Strongyloides venezuelensis*

A execução da *Touchdown PCR* foi realizada conforme protocolo descrito por Fernández-Soto e colaboradores (2016).

*Extração de DNA:* o DNA de amostras de fezes foi extraído utilizando *QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit* (QIAGEN®-Hilden, Alemanha) de acordo com as recomendações do fabricante.

Previamente à extração, foram utilizados diferentes tratamentos para as amostras de fezes: 1- um ou dois ciclos de congelamento e descongelamento em nitrogênio líquido (N<sub>2(l)</sub>) (MACHADO, 2008); 2- duas lavagens em tampão ASL (*QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit* - QIAGEN®) seguida por um ciclo de congelamento e descongelamento em N<sub>2(l)</sub> (CHAVES, 2014); 3- uma lavagem com etanol 70% com homogeneização vigorosa, seguida por duas lavagens

em tampão PBS (Tampão fosfato salino) (SITTA et al., 2014). Os produtos de DNA obtidos para realização da *Touchdown PCR* estão descritos no Anexo.

O DNA de larvas filarioides (L3) foi extraído utilizando o kit *HiPurA™ Multi-Sample DNA Purification* (HiMedia, Índia), protocolo “cauda de roedor” modificado, de acordo com as instruções do fabricante. A modificação consistiu em utilizar aproximadamente 220 mg de sedimento obtido da técnica de Baermann-Moraes para extração de DNA da amostra.

A concentração de DNA das amostras foi estimada por espectrofotometria utilizando *NanoDrop™ 2000 UV-VIS Spectrophotometers* (Thermo Fisher Scientific®).

*Primers*: os iniciadores espécie-específicos utilizados e a sequência de DNA de *S. venezuelensis* analisada foram os mesmos empregados por Fernández-Soto e colaboradores (2016) (Quadros 2 e 3).

**Quadro 2.** Sequências oligonucleotídicas de *primers* obtidos no GenBank com número de acesso AJ417026, utilizados para detecção do DNA de *Strongyloides venezuelensis* nas amostras utilizadas, de acordo com protocolo empregado por Fernández-Soto e colaboradores (2016).

Primers	Sequência oligonucleotídica	Tamanho esperado do produto	Objetivo da amplificação
Sv-F-F3 Sv-R-B3	5'-ACACGCTTTTTATACCACATT-3' 5'-GTGGAGCCGTTTATCAGG-3'	215 pb	Caracterização molecular da espécie

**Quadro 3.** Sequência de bases do DNA ribossômico de *Strongyloides venezuelensis* na qual estão inseridas as sequências dos *primers* (azul e vermelho) utilizadas para a *Touchdown PCR* (Número de acesso no GenBank: AJ417026).

GTTTTAAACATGAAACCGCGGAAAGCTCATTATAACAGCTATAGACTACACGGTAAATATTTT AGTNGGATAACCGATGTAATTCTTGAGCTAATACACGCTTTTTATACCACATTAGTGGTGCG TGGATTGATGAAACCATTTTTTCGGTTGACTCAAAATATCCTTGCTGATTTTGGTATTAAAA CATACCGTATGTGTATCTGGTTTATCACTTTTCGATGGTAGGGTATTGGCCTACCATGGTTG TGACGGATAACGGAGAATTAGGGTTCGACTCCGGATAGGGAGCCTGATAAACGGCTCCAC ATCCAAGGAANGCAGCAGG
--

*Reação*: a reação foi conduzida em volume final de 25 µL contendo 2.5 µL de buffer 10x, 1.5 µL de 25 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 2.5 µL de 2.5 mmol/L dNTPs, 0.5 µL de

100 pmol/μL de primer F3 e B3, 2 U de Platinum Taq DNA polimerase (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) e 10 ng de DNA extraído (volumes ajustados de acordo com cada produto extraído).

*Ciclos de amplificação:*

- 94°C durante 1 min;
- 2x (94°C por 30 s, 57°C por 30s, 72°C por 30s);
- 2x (94°C por 30 s, 56°C por 30s, 72°C por 30s);
- 2x (94°C por 30 s, 55°C por 30s, 72°C por 30s);
- 2x (94°C por 30 s, 54°C por 30s, 72°C por 30s);
- 2x (94°C por 30 s, 53°C por 30s, 72°C por 30s);
- 15x (94°C por 30 s, 52°C por 30s, 72°C por 30s);
- 72°C for 10 min.

As reações de PCR foram realizadas no Termociclador *Applied Biosystems 2720 Thermal Cycler* (Thermo Fisher Scientific®).

Os produtos da reação foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 2% contendo brometo de etídio, em tampão TBE (tampão Tris-Borato-EDTA). Foram acrescentados aos géis um marcador de peso molecular de 100 pares de base (DNA Ladder, Promega), um controle negativo (mix da PCR sem adição de DNA) e um controle positivo. O controle positivo consistiu de DNA extraído de larvas filarioides (L3) que foi gentilmente cedido pela Prof.<sup>a</sup> Mônica Amarante, da Unesp de Botucatu, São Paulo.

A visualização das bandas foi realizada em equipamento com luz ultravioleta *Mini Bis Pro Image Analysis Systems* (DNR Bio Imaging Systems®). O produto da PCR esperado, consistiu em um fragmento de 215 pb.

#### **4.5. Análise dos resultados**

Os dados foram armazenados no programa Microsoft Office Excel 2013, versão para Windows XP e as análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa GraphPad Prism 6.0. Quando necessário a comparação de frequências foi feita utilizando o teste Exato de Fisher. A comparação dos dados morfométricos da presente investigação com os observados na

literatura, foi feita utilizando o teste t de Student para uma amostra. Foram considerados estatisticamente significantes os valores de  $p < 0,05$  (intervalo de confiança de 95%).

#### **4.6. Aspectos éticos**

A presente pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética no Uso de Animais – CEUA/UFES (nº do protocolo 012/2016).

## 5. RESULTADOS

### SÉRIE EXPERIMENTAL A

#### 5.1. Verificação da existência de machos de vida livre de *Strongyloides venezuelensis* em culturas de amostras de fezes de camundongos, gerbilos, ratos Wistar e ratos híbridos selvagens infectados com o parasito, cultivadas em vermiculita ou Koga ágar para verificar a influência da espécie do hospedeiro na diferenciação daquelas formas de vida livre

De modo geral, em culturas originadas dos quatro diferentes hospedeiros utilizados foram encontradas apenas algumas fêmeas de vida livre, não sendo observados machos em nenhuma das culturas examinadas. Chama a atenção o não aparecimento de adultos de vida livre em 20 culturas realizadas a partir de fezes colhidas de camundongos. Os resultados dessas observações estão resumidos na Tabela 1, mostrando não haver diferença estatisticamente significativa na frequência de desenvolvimento de fêmeas de vida livres a partir de ovos eliminados pelos quatro hospedeiros avaliados.

A comparação de culturas em vermiculita e Koga ágar foi feita em camundongos e ratos Wistar. Foram realizadas 83 culturas em vermiculita (20 de camundongos e 63 de ratos) e 39 em Koga ágar (15 de camundongos e 24 de ratos). Das 35 culturas realizadas em fezes de camundongos infectados nenhuma foi positiva para o aparecimento de adultos de vida livre. Das 87 culturas realizadas em fezes de ratos Wistar três foram positivas para fêmeas de vida livre, sendo duas em culturas em vermiculita (2/63 ou 3,17%) e uma (1/24 ou 4,17%) em cultura em placa de ágar. Esses resultados mostram que não houve influência do meio de cultura na frequência de aparecimento de adultos de vida livre (vermiculita ou ágar, respectivamente 2/63 e 1/24;  $p > 0,05$ ).

Vale ressaltar que, em 30,8% (12/39) das placas de ágar e em 24,1% (20/83) das culturas em vermiculita não foi observada eclosão de larvas, apesar das fezes conterem um número suficiente de ovos embrionados.

Culturas em vermiculita foram realizadas em fezes de gerbilos e ratos híbridos selvagens. Foram feitas 298 culturas (175 de fezes de gerbilos e 123 de fezes



de ratos híbridos selvagens). Dessas 298 culturas, 12 foram positivas para fêmeas de vida livre: 9/175 (5,14%) nas de fezes de gerbilos e 3/123 (2,44%) nas de fezes dos ratos híbridos selvagens. Esses dados confirmam que o desenvolvimento de formas de vida livre é baixo, especialmente de machos, que não foram observados em nenhuma das culturas realizadas.

O uso das culturas em placas de ágar foi descontinuado devido a menor quantidade de larvas que foram encontradas (1/39 em ágar e 14/361 em vermiculita, respectivamente 2,6 e 3,9%). Dessa forma, padronizamos para os demais experimentos o uso de culturas em vermiculita, devido ao melhor rendimento observado.

**Tabela 1.** Culturas de fezes em vermiculita positivas para adultos de vida livre de *Strongyloides venezuelensis* de amostras provenientes de camundongos, gerbilos, ratos Wistar e ratos híbridos selvagens.

<b>Hospedeiros*</b> <b>(nº de culturas)</b>	<b>Culturas (+)</b> <b>para Fêmeas</b>	<b>Culturas (+)</b> <b>para Machos</b>
Camundongos (20)	0 (0,0%)	0 (0,0%)
Gerbilos (175)	9 (5,14%)	0 (0,0%)
Ratos Wistar (63)	2 (3,17%)	0 (0,0%)
Ratos híbridos selvagens (123)	3 (2,44%)	0 (0,0%)

\*valor de p não foi estatisticamente significativo para comparação entre os grupos.

## **5.2. Influência da idade do hospedeiro, da dose do inóculo, da exposição prévia às larvas e da redução da temperatura das coproculturas antes da incubação a 28°C na evolução das formas de vida livre do parasito, especialmente no aparecimento de machos de vida livre**

### **(a) Verificação da influência da idade do hospedeiro**

Não foram observados machos de vida livre. Foram encontradas fêmeas de vida livre apenas nos animais com idade entre 60 e 70 dias, porém sem diferença significativa na frequência dessas fêmeas. Os resultados estão resumidos na Tabela 2.

**Tabela 2.** Avaliação do efeito da idade do hospedeiro na frequência de adultos de vida livre em culturas de fezes em vermiculita de amostras de ratos Wistar infectados com 3000 larvas L3 de *Strongyloides venezuelensis*.

Idade em dias* (n° de culturas)	Culturas (+) para Fêmeas	Culturas (+) para Machos
25-30 (40)	0 (0,0%)	0 (0,0%)
60-70 (25)	1 (4,0%)	0 (0,0%)
120 (17)	0 (0,0%)	0 (0,0%)

\*valor de p não foi estatisticamente significativo entre os grupos.

**(b) Verificação da influência da quantidade de larvas no inóculo**

Neste experimento, não houve desenvolvimento de machos em nenhuma das culturas analisadas, bem como não houve diferença significativa no aparecimento das fêmeas de vida livre nas culturas de fezes dos ratos Wistar. Resultados semelhantes foram observados para os ratos híbridos selvagens e para os camundongos. Os resultados estão resumidos na Tabela 3.

**Tabela 3.** Avaliação do efeito da dose de inoculação na frequência de adultos de vida livre em culturas de fezes em vermiculita de amostras de ratos Wistar, ratos híbridos selvagens e camundongos infectados com *Strongyloides venezuelensis*.

Hospedeiro	Dose do inóculo (n° de culturas)	Culturas (+) para Fêmeas	Culturas (+) para Machos
Ratos Wistar <sup>a</sup>	3.000 (82)	1 (1,22%)	0 (0,0%)
	5.000 (32)	1 (3,13%)	0 (0,0%)
	15.000 (31)	1 (3,23%)	0 (0,0%)
Ratos híbridos selvagens <sup>b</sup>	500 (41)	0 (0,0%)	0 (0,0%)
	1.000 (41)	1 (2,4%)	0 (0,0%)
	1.500 (41)	2 (4,9%)	0 (0,0%)
Camundongos <sup>c</sup>	200 (22)	0 (0,0%)	0 (0,0%)
	400 (22)	0 (0,0%)	0 (0,0%)
	600 (22)	0 (0,0%)	0 (0,0%)
	800 (22)	0 (0,0%)	0 (0,0%)

<sup>a, b, c</sup> valor de p não foi estatisticamente significativo, independente do grupo de animais estudado.

**(c) Verificação da influência da infecção prévia do hospedeiro**

Todos os animais inoculados com a dose sensibilizante adquiriram a infecção demonstrada pela presença de ovos nas fezes investigados em diferentes dias após a infecção (não mostrado). A análise das coproculturas revelou ausência de machos de vida livre. Quanto à presença de fêmeas de vida livre, das 88 culturas de fezes do animal controle examinadas, apenas uma foi positiva (1/88; 1,14%). Nos animais previamente sensibilizados, foram observadas quatro culturas positivas para fêmeas de vida livre em 264 culturas examinadas (4/264; 1,52%). Não houve diferença estatisticamente significativa entre o grupo controle e o total de sensibilizados. Também não houve diferença estatística significativa entre os grupos de sensibilizados, independente da dose (Tabela 4).

**Tabela 4.** Frequência de formas de vida livre em culturas de fezes em vermiculita de ratos Wistar que eliminaram uma infecção com 5, 30 ou 60 larvas L3 de *Strongyloides venezuelensis* (sensibilizados) e de ratos Wistar virgens, sendo que os dois grupos receberam uma dose desafio de 250 larvas L3 do parasito.

Grupos (n° de culturas)	Culturas (+) para Fêmeas	Culturas (+) para Machos
Controle (88) <sup>a</sup>	1 (1,14%)	0 (0,0%)
5 larvas L3 (88) <sup>b</sup>	2 (2,27%)	0 (0,0%)
30 larvas L3 (88) <sup>c</sup>	1 (1,14%)	0 (0,0%)
60 larvas L3 (88) <sup>d</sup>	1 (1,14%)	0 (0,0%)
Total de sensibilizados (264) <sup>e</sup>	4 (1,52%)	0 (0,0%)

<sup>a, e</sup> Não houve diferença estatística significativa entre os grupos controle e total de sensibilizados. <sup>b, c, d</sup> Não houve diferença estatística significativa entre os grupos sensibilizados com diferentes doses.

**(d) Verificação da influência da redução da temperatura na fase inicial da coprocultura**

O resfriamento prévio da cultura mostrou efeito significativo nas culturas de fezes dos ratos híbridos selvagens, onde o procedimento aumentou significativamente a diferenciação de fêmeas de vida livre. Também não foram observados machos nas culturas analisadas. Os resultados estão resumidos na Tabela 5.

**Tabela 5.** Frequência de adultos de vida livre em culturas de fezes em vermiculita submetidas ao resfriamento a 6°C por 15 minutos antes da incubação a 28°C, provenientes de ratos Wistar, ratos híbridos selvagens e camundongos infectados com *Strongyloides venezuelensis*.

Hospedeiro	Resfriamento prévio a 6°C			
	Sim		Não	
	Culturas (+) p/ Fêmeas <sup>a</sup>	Culturas (+) p/ Machos <sup>a</sup>	Culturas (+) p/ Fêmeas <sup>a</sup>	Culturas (+) p/ Machos <sup>a</sup>
Ratos Wistar	1/88 (1,14%)	0/88 (0,0%)	1/88 (1,14%)	0/88 (0,0%)
Ratos híbridos selvagens <sup>b</sup>	12/123 (9,76%)	0/123 (0,0%)	3/123 (2,44%)	0/123 (0,0%)
Camundongos	1/88 (1,14%)	0/88 (0,0%)	0/88 (0,0%)	0/88 (0,0%)

<sup>a</sup> N° de culturas positivas para o gênero indicado/N° total de culturas.

<sup>b</sup> Teste Exato de Fisher, p=0,029.

## SÉRIE EXPERIMENTAL B

### 5.3. Análise das culturas positivas para fêmeas de vida livre durante períodos mais longos de incubação, para verificar a manutenção do ciclo de vida livre

Para fazer uma análise mais prolongada das culturas positivas para fêmeas de vida livre, as trouxas provenientes da técnica de Baermann-Moraes foram reincubadas no frasco que continha a cultura e analisadas nos dias seguintes com ou sem novas reincubações.

Uma amostra de fezes de camundongo infectado com *S. venezuelensis* foi cultivada e examinada no 3º dia pós-cultivo. Após análise pela técnica de Baermann-Moraes, fêmeas de vida livre foram detectadas e a trouxa contendo a cultura foi reincubada e examinada nos dias posteriores, repetindo essa operação até a 3ª reincubação, quando apareceram machos de vida livre. A manutenção da cultura foi repetida em dias sucessivos até a 8ª reincubação. A detecção de machos de vida livre só foi feita até a 5ª reincubação.

Este fato foi novamente observado em outro experimento com uma cultura de fezes de rato híbrido selvagem. A cultura foi examinada no 3º dia pós-cultivo sendo positiva para uma fêmea de vida livre; a trouxa foi reincubada e analisada nos dois dias seguintes quando foi observado um macho de vida livre.

#### 5.4. Verificação da partenogênese das fêmeas de vida livre de *Strongyloides venezuelensis*

Para verificar a participação de fêmeas partenogenéticas na manutenção do ciclo de vida livre de *S. venezuelensis*, foram realizadas 110 culturas em meio estéril com um único ovo proveniente de fêmeas de vida livre das culturas de manutenção.

Como pode ser observado, os testes foram positivos em 58,2% (64/110) das culturas. Vale ressaltar que, em 4,5% (5/110) das culturas foram observadas uma única larva L3. Os resultados estão resumidos na Tabela 6.

**Tabela 6.** Número de culturas positivas para cada forma evolutiva de *Strongyloides venezuelensis* observada a partir de um único ovo proveniente de fêmeas de vida livre. Foram considerados positivos os testes nos quais apareceram mais de duas larvas L1/L2 ou L3 ou fêmeas de vida livre no terceiro dia de cultivo.

Número de culturas positivas para cada forma evolutiva observada dentre 110 culturas realizadas		
≥ 2 L1/L2	≥ 2 L3	≥ 1 fêmea de vida livre
13 (11,8%)	10 (9,1%)	41 (37,3%)

#### 5.5. Evolução da geração de vida livre

Foi possível encontrar fêmeas de vida livre maduras em culturas das fezes do hospedeiro incubadas por 48 horas.

Observou-se que, ovos em fase de mórula eliminados por fêmeas de vida livre eclodiram dentro de 5 a 6 horas. Fêmea imatura foi observada após 24 horas de cultivo das culturas com ovos larvados. Fêmeas de vida livre foram encontradas com até 24 ovos no útero. Além disso, foi possível verificar que muitas fêmeas colocavam ovos em estágios iniciais de segmentação, o que parecia ser uma estratégia para a rápida produção de um novo lote de ovos.

## 5.6. Caracterização morfométrica e molecular de *Strongyloides venezuelensis*

### 5.6.1. Caracterização morfométrica das formas evolutivas de *Strongyloides venezuelensis*

Os dados morfométricos estão apresentados separadamente para cada forma evolutiva do parasito.

#### Fêmeas partenogenéticas parasitas

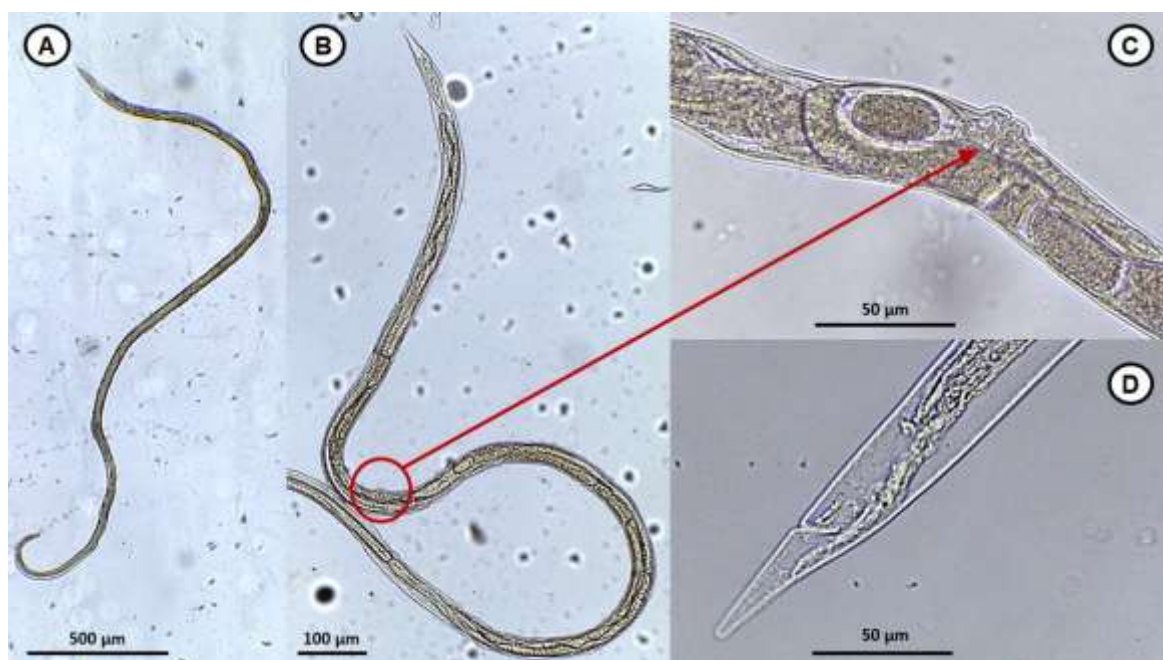
Coloração esbranquiçada, corpo delgado e cauda curta e cônica (Figura 7). Esôfago filariforme, vulva localizada no terço posterior do corpo e sistema reprodutor anfidelfo. Os principais dados morfométricos estão apresentados na Tabela 7.

**Tabela 7.** Dados morfométricos de fêmeas partenogenéticas parasitas de *Strongyloides venezuelensis* recuperadas de gerbilo. Os valores apresentados em micrômetros representam a média e o desvio padrão, com IC 95% entre parênteses.

Variáveis	Fêmeas partenogenéticas parasitas (n=10)
Comprimento	2844±239,7 (2672-3015)
Largura	38,9±4,2 (35,9-41,9)
Esôfago	609,0±25,5 (590,7-627,2)
Boca/Vulva <sup>a</sup>	1940±131,0 (1846-2033)
Cauda <sup>b</sup>	51,3±4,0 (47,9-54,7)

<sup>a</sup> Distância extremidade anterior-vulva.

<sup>b</sup> Distância ânus-extremidade posterior.



**Figura 7.** Fêmea partenogenética parasita de *Strongyloides venezuelensis*. A- visão geral; B- terço posterior do corpo indicando posição da vulva; C- detalhe da vulva e ovo; D- detalhe da cauda.

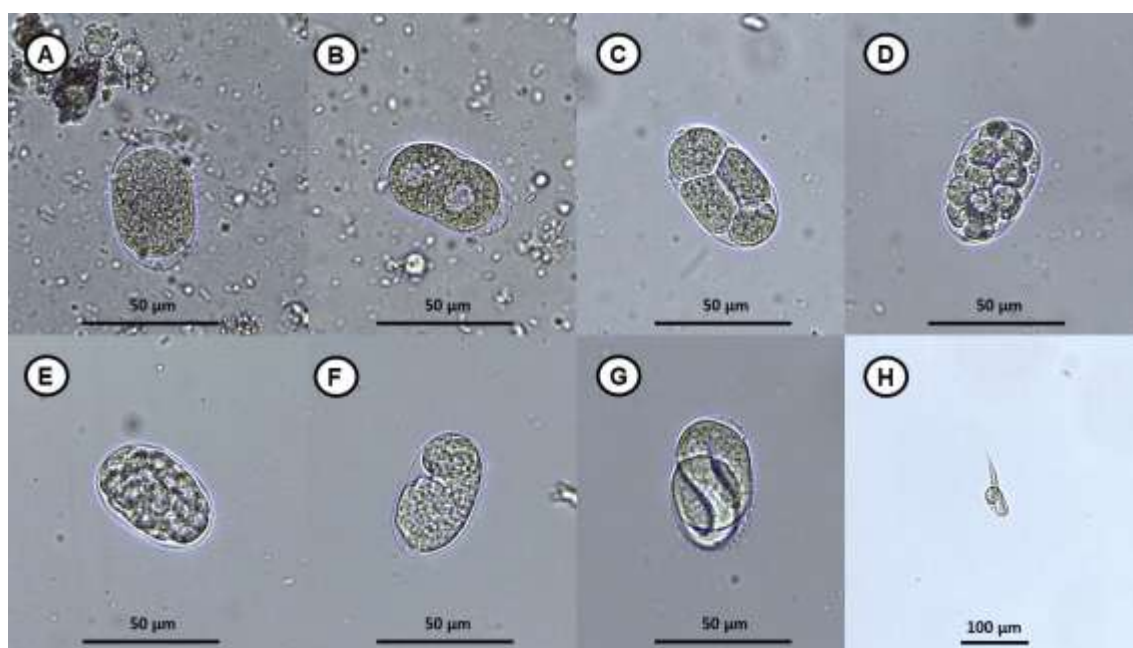
## Ovos

Estrutura elíptica, membrana fina, comprimento de aproximadamente 50 µm e largura de 27 µm, não havendo diferenças significativas entre os ovos eliminados por fêmeas partenogenéticas parasitas ou de vida livre.

Os ovos das fêmeas partenogenéticas parasitas foram obtidos diretamente das fezes do hospedeiro e se apresentaram embrionados ou larvados. Já os ovos das fêmeas de vida livre puderam ser encontrados nas culturas em estágios iniciais de segmentação (blastômero). Foi possível observar ovos em diferentes estágios de desenvolvimento em culturas e no interior do útero das fêmeas de vida livre (Figura 8). Os dados morfométricos dos ovos de ambas as fêmeas estão apresentados na Tabela 8.

**Tabela 8.** Dados morfométricos dos ovos de *Strongyloides venezuelensis* obtidos de fêmeas partenogenéticas parasitas e de fêmeas de vida livre, ambos provenientes de culturas de fezes de ratos híbridos selvagens. Os valores apresentados em micrômetros representam a média e o desvio padrão, com IC 95% entre parênteses.

Variáveis	Ovos de fêmeas parasitas (n=40)	Ovos de fêmeas de vida livre (n=40)
Comprimento	50,1±2,5 (49,3-50,9)	50,6±1,9 (49,9-51,2)
Largura	27,6±1,0 (27,3-27,9)	28,9±1,5 (28,4-29,4)



**Figura 8.** Ovos de fêmeas de vida livre de *Strongyloides venezuelensis* em diferentes estágios de desenvolvimento. A- ovo antes da primeira divisão; B- ovo com dois blastômeros; C- ovo com visivelmente quatro blastômeros; D- ovo com múltiplos blastômeros; E- ovo morulado; F- ovo embrionado; G- ovo larvado; H- eclosão da larva.

### Larvas filarioides (L3)

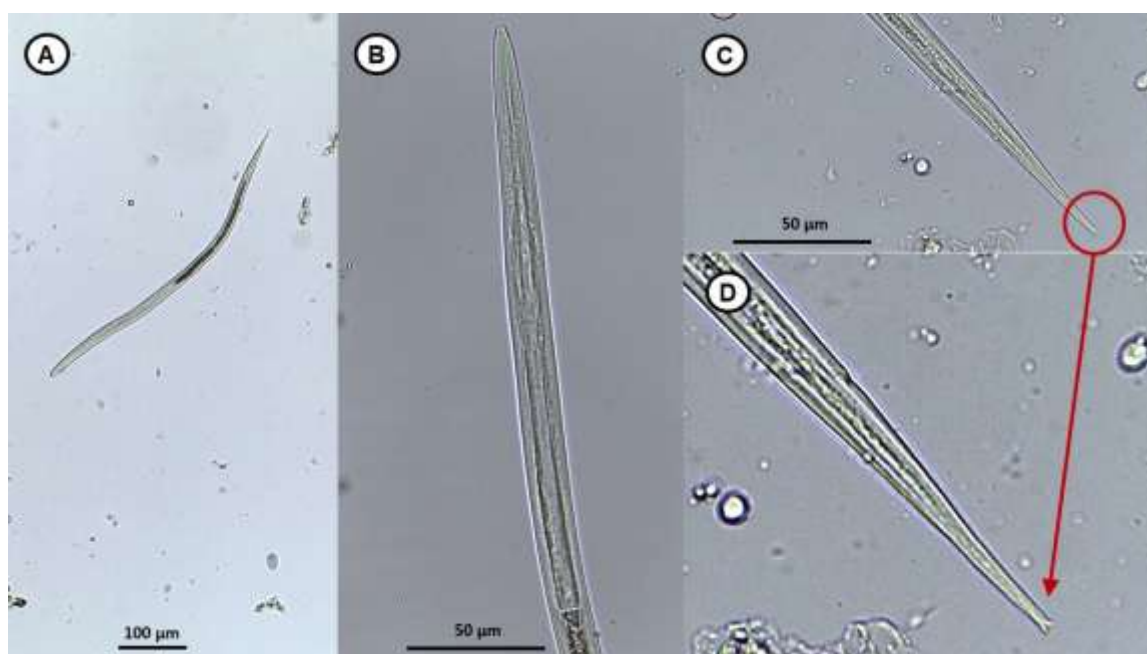
Larvas (L3) alongadas, esôfago filariforme ocupando quase metade do comprimento do corpo, cauda com extremidade entalhada (Figura 9). Os dados morfométricos das larvas L3 estão apresentados na Tabela 9.



**Tabela 9.** Dados morfométricos de larvas filarioides (L3) de *Strongyloides venezuelensis* recuperadas de coproculturas de ratos híbridos selvagens. Os valores apresentados em micrômetros representam a média e o desvio padrão, com IC 95% entre parênteses.

Variáveis	Larvas filarioides (L3) (n=20)
Comprimento	564,2±41,5 (544,8-583,7)
Largura	18,6±1,3 (17,9-19,1)
Esôfago	252,7±20,6 (243,0-262,3)
Cauda*	62,2±3,0 (60,7-63,6)

\*Distância ânus-extremidade posterior.



**Figura 9.** Larva filarioide de *Strongyloides venezuelensis*. A- visão geral; B- detalhe do esôfago; C- detalhe da cauda com entalhe característico; D- detalhe ampliado da cauda (sem escala).

### Fêmeas de vida livre

Corpo de aspecto fusiforme, extremidade anterior arredondada, com uma expansão na forma de coroa. Anel nervoso localizado na altura do istmo esofagiano e esôfago rabditoide com as divisões bem evidentes. Vulva com lábios proeminentes localizada aproximadamente na metade do corpo, sistema reprodutor anfidelfo e cauda afilada (Figura 10). Os dados morfométricos estão apresentados na Tabela 10.

**Tabela 10.** Dados morfométricos de fêmeas de vida livre de *Strongyloides venezuelensis* recuperadas de coproculturas de ratos híbridos selvagens. Os valores apresentados em micrômetros representam a média e o desvio padrão, com IC 95% entre parênteses.

Variáveis	Fêmeas de vida livre (n=24)
Comprimento	967,5±122,8 (915,6-1019)
Largura	50,1±7,6 (46,9-53,4)
Esôfago total	146,0±5,9 (143,5-148,5)
Boca/Vulva <sup>a</sup>	461,6±51,6 (439,8-483,4)
Cauda <sup>b</sup>	140,6±23,6 (130,6-150,5)

<sup>a</sup> Distância extremidade anterior-vulva.

<sup>b</sup> Distância ânus-extremidade posterior.



**Figura 10.** Fêmea de vida livre de *Strongyloides venezuelensis*. A- visão geral; B- detalhe do esôfago; C- detalhe da vulva e ovos; D- detalhe da cauda.

### Machos de vida livre

Corpo fusiforme, extremidade anterior truncada e cauda ligeiramente recurvada ventralmente terminando em processo caudal afilado. Esôfago rabditoide. Presença de um par de espículos recurvados e morfologicamente idênticos; gubernáculo, membrana ventral proeminente e sete pares de papilas caudais

pedunculadas (Figura 11). Os dados morfométricos dos machos estão apresentados na Tabela 11.

**Tabela 11.** Dados morfométricos de machos de vida livre de *Strongyloides venezuelensis* recuperados de culturas de manutenção provenientes de ratos híbridos selvagens. Os valores apresentados em micrômetros representam a média e o desvio padrão, com IC 95% entre parênteses.

Variáveis	Machos de vida livre (n=16)
Comprimento	590,8±79,4 (548,5-633,1)
Largura	25,0±3,3 (23,3-26,8)
Esôfago total	118,4±6,1 (115,2-121,7)
Cauda*	34,7±2,3 (33,5-35,9)
Espículo	28,4±2,4 (27,2-29,7)

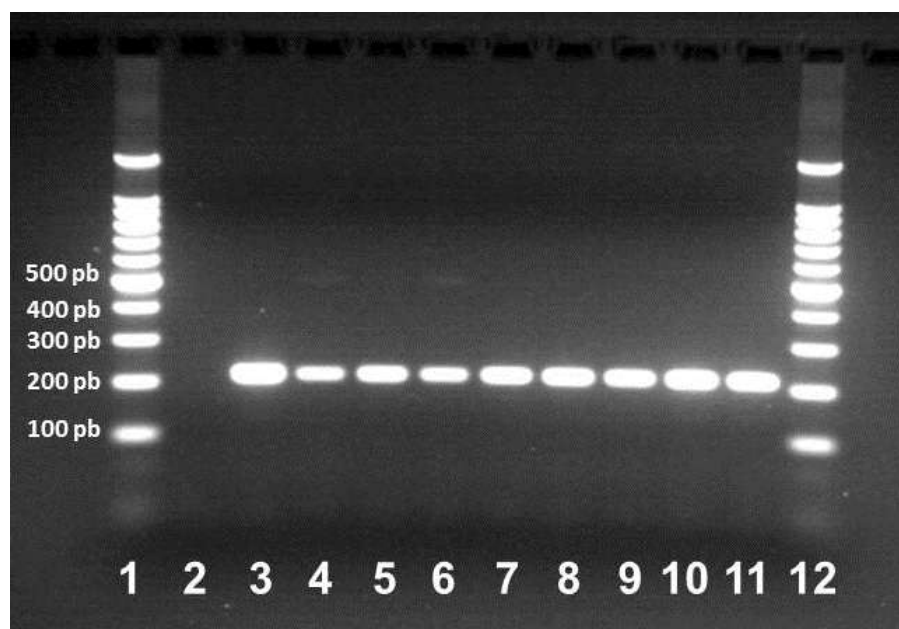
\* Distância ânus-extremidade posterior.



**Figura 11.** Macho de vida livre de *Strongyloides venezuelensis*. A- visão geral; B- detalhe do esôfago; C- vista lateral da extremidade posterior com detalhe dos espículos e do processo caudal afilado; D- vista ventral da extremidade posterior com detalhe da membrana ventral e das papilas caudais pedunculadas.

### 5.6.2. Caracterização molecular de *Strongyloides venezuelensis*

A PCR convencional empregando o protocolo de Marra e colaboradores (2010), os únicos pesquisadores a utilizarem iniciadores espécie-específicos para identificação de *S. venezuelensis* por essa técnica, apresentou resultado insatisfatório (dados não mostrados). Dessa forma, utilizou-se a técnica de *Touchdown PCR* de acordo com o protocolo de Fernández-Soto e colaboradores (2016), para a identificação específica do parasito. Neste ensaio, as bandas de aproximadamente 215 pb (Figura 12) correspondem aos fragmentos de DNA de *S. venezuelensis*, de acordo com esses autores, confirmando que o parasito utilizado em nossos experimentos é da espécie *S. venezuelensis*.



**Figura 12.** Fotografia do gel de agarose a 2% dos produtos amplificados pela *Touchdown PCR* com o uso dos *primers* F3 e B3 (Fernández-Soto et al., 2016) de DNA extraído de várias amostras contendo *Strongyloides venezuelensis*. Colunas 1 e 12: marcador de tamanho molecular 100 pb ladder (Life Technologies); coluna 2: controle negativo (sem DNA); coluna 3: controle positivo; colunas 4, 7 e 8: banda de amplificação de 215 pb a partir de amostras de DNA de *S. venezuelensis* de fezes submetidas ao tratamento em  $N_{2(l)}$ ; coluna 5: banda de amplificação de 215 pb a partir de amostras de DNA de *S. venezuelensis* de fezes submetidas ao tratamento em etanol e PBS; coluna 6: banda de amplificação de 215 pb a partir de amostras de DNA de *S. venezuelensis* de fezes submetidas ao tratamento em tampão ASL e  $N_{2(l)}$ ; coluna 9: banda de amplificação de 215 pb a partir de amostras de DNA de *S. venezuelensis* de fezes adicionadas de larvas L1 submetidas ao tratamento em  $N_{2(l)}$ ; colunas 10 e 11: banda de amplificação de 215 pb a partir de amostras de DNA de *S. venezuelensis* de sedimento do Baermann-Moraes contendo larvas L3.

## 6. DISCUSSÃO

Os resultados da Série Experimental A, que visaram verificar o desenvolvimento de formas adultas de vida livre de *S. venezuelensis*, com variações no hospedeiro, no meio de cultivo das fezes, na temperatura de incubação e na exposição prévia ao parasito, mostraram, de modo geral, que nas culturas examinadas com três dias de incubação, a presença de formas adultas era infrequente, com ausência de machos.

Esses resultados não sofreram influência significativa do meio de cultura (placa de ágar ou vermiculita). O aparecimento de formas adultas de vida livre foi mais frequente nas culturas em vermiculita, confirmando que esse meio é adequado e eficiente para o cultivo de ovos de *Strongyloides* spp. (RIBEIRO et al., 2014). Embora Hino e colaboradores (2014) tenham obtido bons resultados com cultivos de ovos de *S. venezuelensis* em placas de ágar, nos experimentos aqui mostrados o resultado não foi satisfatório (uma cultura positiva em 39 realizadas). No entanto, no trabalho de Hino e colaboradores (2014) 52 placas de 162 cultivadas não apresentaram desenvolvimento dos ovos, confirmando que é frequente o não desenvolvimento dos ovos nas placas de ágar. Também, Sandground (1926) admitiu que, por mais eficiente que sejam os métodos de cultura em placas de ágar, eles podem ser defeituosos para a demonstração da geração de vida livre quando esta é representada em pequenos números (como no caso de *S. venezuelensis*), uma vez que os adultos de vida livre raramente migram da massa fecal. Essa observação é válida especialmente em estudos em que só há inspeção visual das placas.

Esse estudo foi o primeiro a utilizar quatro diferentes hospedeiros para verificar a influência desse fator sobre o desenvolvimento de adultos de vida livre de *S. venezuelensis*. Os resultados mostraram que nos quatro hospedeiros utilizados não houve diferença significativa no desenvolvimento de formas de vida livre, inclusive sem o aparecimento de machos. Esse resultado mostra que hospedeiros diferentes do hospedeiro habitual não influenciaram o desenvolvimento de formas de vida livre, embora não tenham sido feitas comparações com o hospedeiro natural do parasito – *R. norvegicus* selvagem. É possível que ovos provenientes de infecção de ratos selvagens originem

formas de vida livre mais frequentemente, inclusive machos. De fato, há uma observação publicada em um resumo, que relatou o aparecimento de machos de vida livre a partir de incubação de ovos obtidos de ratos selvagens (LITTLE, 1961, apud LITTLE, 1966). Pesquisas utilizando ratos selvagens infectados são necessárias para verificar se o aparecimento de machos é realmente mais frequente quando os ovos se originam do hospedeiro natural.

A idade dos ratos e as doses infectantes adotadas não influenciaram na frequência de encontro de fêmeas de vida livre. Na literatura, há uma observação relatando que a idade foi fator importante no desenvolvimento de formas de vida livre do parasito (PEGORARO, 1999). A autora mostrou que o número de fêmeas de vida livre de *S. venezuelensis* foi maior em culturas de ratos mais velhos (60 dias de vida). Além disso, observou que o número de fêmeas aumenta com o tempo de duração da infecção e com maior número de larvas infectantes inoculadas. Em nossos experimentos foram utilizados ratos Wistar com idades de aproximadamente 30, 70 e 120 dias e doses entre 3.000 a 15.000 L3 em ratos. Em nosso estudo, a idade do hospedeiro no momento da infecção e a carga infectante não tiveram efeito sobre o desenvolvimento do ciclo de vida livre do parasito. É necessário estudo posterior para investigar se o tempo de duração da infecção pode influenciar esse ciclo.

Quanto ao impacto da exposição prévia a baixas doses (5, 30 e 60 L3) de larvas infectantes de *S. venezuelensis* em ratos Wistar submetidos a uma nova infecção com 250 L3, os resultados não mostraram diferenças significativas dessa exposição prévia no desenvolvimento das formas de vida livre, em comparação com ratos não reinfetados. Esse experimento foi realizado porque Gemmill e colaboradores (1997) e Harvey e colaboradores (2000) verificaram que a proporção de formas de vida livre de *S. rattii* produzidas após a infecção desafio, aumentou em todos os grupos de animais previamente expostos. Os resultados aqui descritos demonstram que para *S. venezuelensis* parece não haver influência do estado imunitário do hospedeiro na evolução das formas de vida livre do nematoide.

De acordo com a literatura, culturas de ovos de *S. rattii* incubadas a baixas temperaturas (15°C) ocasionam desenvolvimento direto das larvas, enquanto

incubação em temperatura mais alta (25°C) induz o desenvolvimento indireto (VINEY 1996; MINATO et al., 2008; SAKAMOTO e UGA, 2013). No início dos experimentos, em nossas culturas de gerbilos e ratos Wistar incubadas sempre a 28°C, muito raramente se verificavam formas de vida livre de *S. venezuelensis*. Dessa forma, em uma tentativa de investigar se o resfriamento prévio poderia influenciar no desenvolvimento de adultos de vida livre, as culturas eram submetidas a um resfriamento a 6°C durante 15 minutos, antes da incubação a 28°C. Os resultados demonstraram que não houve diferença significativa no desenvolvimento de adultos de vida livre em culturas de amostras de ratos Wistar e camundongos submetidas ao resfriamento prévio. No entanto, para os ratos híbridos selvagens o resfriamento prévio das culturas aumentou significativamente a diferenciação de fêmeas de vida livre. Nossos resultados demonstram que a temperatura influencia no desenvolvimento das formas de vida livre de *S. venezuelensis*, embora o fenômeno pareça ser dependente do hospedeiro. Investigações futuras, com cultivos das fezes originadas de ratos Wistar e ratos híbridos, em temperaturas diferentes, podem esclarecer melhor a influência deste fator no ciclo de vida livre do parasito.

Os resultados da Série Experimental B, na qual as culturas foram analisadas por maior tempo, mostraram observações inéditas sobre a biologia de *S. venezuelensis*, especialmente sobre o seu ciclo de vida livre. Ficou bem demonstrada a persistência do desenvolvimento da geração de vida livre em culturas reincubadas após o terceiro dia de incubação e analisadas a partir de 24 horas após a reincubação. Nessas análises já se observavam fêmeas com ovos e progressivamente larvas em diferentes estádios. Como nas análises das culturas primárias não apareciam machos, essa observação de uma progênie com fêmeas de vida livre e larvas em diferentes estádios, sugeriu a existência de fêmeas partenogenéticas de vida livre mantendo o ciclo indireto. A confirmação dessa suspeita foi feita com a clonagem de ovos que incubados isoladamente em meio estéril, originaram fêmeas que, mantidas na cultura, produziram gerações de formas de vida livre. Como foi cultivado apenas um ovo, conclui-se que toda a progênie observada nas culturas foi proveniente da fêmea evoluída daquele ovo.

Outra observação importante nesses experimentos foi que a reincubação das culturas positivas para fêmeas após três dias, mostrou o aparecimento de machos, embora o fenômeno não tenha sido tão frequente. Esse dado mostra que a não observação de machos relatada na literatura pode ter sido devido ao fato de que nesses trabalhos as culturas eram observadas apenas três dias após a incubação. De fato, nos experimentos aqui relatados, em todas as culturas examinadas com três dias de incubação, não foram encontrados machos de vida livre. Esses só foram vistos quando culturas positivas para fêmeas eram reincubadas. Pode-se admitir que, machos aparecem mais tardiamente porque são originados de fêmeas partenogéticas de primeira geração.

Não há descrição na literatura de experimentos de reincubação de culturas positivas para fêmeas de vida livre de *S. venezuelensis*. Hino e colaboradores (2014) cultivando ovos de *S. venezuelensis* em ágar observaram a presença de fêmeas nas culturas, inclusive com ovos; no entanto, segundo esses autores esses ovos eliminados no meio de cultivo não eclodiam. Já Dulovic e colaboradores (2016) cultivaram ovos de *S. ratti* em placas de ágar enriquecido (NGM - Meio para crescimento de nematoides, utilizado para cultivo de *Caenorhabditis elegans*), e admitiram que, embora as formas adultas de vida livre tenham sobrevivido, a reprodução desses adultos em placas de ágar é consideravelmente menor em comparação com a cultura em fezes do hospedeiro. Desse modo os autores concluíram que os meios de cultivo influenciam a evolução das formas de vida livre de *S. ratti*, havendo exigências de meios nutritivamente mais ricos. No caso de *S. venezuelensis* os resultados aqui observados demonstram que as formas de vida livre podem manter o ciclo indireto por longo tempo, no meio de vermiculita enriquecido com fezes, inclusive a partir de fêmeas partenogéticas.

De acordo com essas observações, verificou-se que o ciclo de vida livre de *S. venezuelensis* muito se assemelha ao de *Parastrongyloides trichosuri*, um táxon próximo ao gênero *Strongyloides* (DORRIS et al., 2002). Este nematoide é parasito de gambás australianos e pode passar por indefinidas gerações de vida livre, desde que seja mantido em condições adequadas de cultivo. *Parastrongyloides trichosuri* compartilha um ciclo de vida livre e um ciclo



parasitário, com a presença de machos em ambos os ciclos (GRANT et al., 2006). Como verificado nesse estudo, a manutenção do ciclo de vida livre de *S. venezuelensis* por inúmeras gerações em laboratório, permite sugerir que, é possível que este parasito, durante a transição evolutiva, possa ter adotado características semelhantes ao observado no ciclo de vida livre de *P. trichosuri*.

Esses resultados mostrando manutenção do ciclo indireto de *S. venezuelensis* após reincubação de culturas positivas para fêmeas de vida livre não tem similares na literatura. No entanto, a manutenção do ciclo indireto já foi relatada para outras espécies do gênero *Strongyloides*. Três gerações do ciclo indireto em *S. simiae* foram relatadas por Beach (1936) em uma única placa de cultura, após quatro dias de cultivo. Augustine (1940) relatou gerações consecutivas de *S. simiae*, *S. fuelleborni* e de um *Strongyloides* sp isolado de primata, porém sempre transferindo adultos de vida livre para um meio fresco. Neste caso, não pode ser excluída a possibilidade de que os vermes transplantados permaneceram vivos e foram transferidos para sistemas de cultura para a próxima geração. Já Yamada e colaboradores (1991) cultivaram ovos de fêmeas de vida livre de *S. planiceps* em papel de filtro, com fezes de cão frescas e livres de parasitos, e observaram nove gerações de vida livre do parasito.

Já foi demonstrado que, a partenogênese em nematoides pode ser favorecida quando a probabilidade de encontrar um macho é suficientemente baixa (TOMLINSON, 1966, apud DENVER et al., 2011). É possível que esse fato tenha ocorrido no ciclo de vida livre de *S. venezuelensis*. Por outro lado, o ciclo de vida livre é o único momento para as trocas genéticas das espécies do gênero *Strongyloides*. No entanto, parece que isso não ocorre em uma primeira geração de *S. venezuelensis*. Sugerimos que na primeira geração de vida livre a reprodução se deu por partenogênese, que provavelmente persistiu durante as novas gerações. No entanto, não se pode excluir a possibilidade de ter ocorrido reprodução sexuada ou pseudogamia nas gerações posteriores (após o aparecimento de machos). Quanto à pseudogamia, processo em que o espermatozoide apenas estimula o óvulo, a presença de machos que geneticamente não contribuem para as próximas gerações dificulta a compreensão em termos evolutivos. O que se sabe é que o filo Nematoda é

conhecido por conter uma diversidade de espécies com significativa plasticidade reprodutiva (DENVER et al., 2011). No gênero *Strongyloides* podem ser encontrados diferentes modos de reprodução, e conforme argumentado por Sandground (1926), a partenogênese realmente pode ocorrer na geração de vida livre, no entanto é incomum e restrita a algumas espécies. Nossos resultados demonstraram que, em infecções de ratos com *S. venezuelensis*, a ausência de machos de primeira geração sugere a ocorrência da partenogênese. São necessários estudos mais aprofundados para verificar a evolução reprodutiva de *S. venezuelensis*.

Fêmeas de vida livre maduras de *S. venezuelensis* surgiram com 48 horas de incubação de cultura das fezes do hospedeiro o que concorda com o estudo de Premvati (1958b) utilizando *S. fuelleborni*. Vale ressaltar que o tempo necessário para o aparecimento das formas de vida livre é determinado pela temperatura de incubação da cultura (PREMVATI, 1963). No entanto, é possível que o meio de cultivo e a espécie do nematoide também possam influenciar nessa característica.

Uma característica importante observada nos experimentos de reincubação foi a rapidez com que as formas de vida livre apareciam. Ovos em fase de mórula eliminados por fêmeas eclodiram dentro de 5 a 6 horas. As larvas originadas também evoluíram rapidamente: com 24 horas de cultivo de ovos larvados foi observada uma fêmea imatura. A rapidez da eclosão dos ovos foi descrita por Basir (1950) em estudo com *S. papillosus*, onde ovos originados de fêmeas de vida livre eclodiram entre 6 e 10 horas após a eliminação. No entanto, Hansen e colaboradores (1969) admitiram que fêmeas de segunda geração de *S. fuelleborni* estavam presentes em culturas com dois dias de incubação, como demonstrado em nosso estudo.

Sabe-se que, de forma geral entre os nematoides, o número de machos é geralmente menor que o de fêmeas, como também é o caso no gênero *Strongyloides* (Premvati, 1958a). Os resultados deste estudo corroboram essa observação para gerações de vida livre posteriores, ressaltando que não foram observados machos de vida livre de primeira geração. No entanto, não se pode

excluir a possibilidade de existência, mesmo que rara, de machos de primeira geração de *S. venezuelensis*.

Corroborando a hipótese de Augustine (1940), ao estudar consecutivas gerações de vida livre de diferentes espécies de *Strongyloides*, é possível que, o desenvolvimento indireto de *S. venezuelensis* possa continuar indefinidamente em um ambiente altamente favorável como as condições laboratoriais, que podem ser controladas. No entanto, provavelmente tais condições não acontecem na natureza, ou ocorrem muito raramente.

Quanto à caracterização morfométrica, é possível que as variações observadas nas formas evolutivas aqui estudadas (dados não mostrados), em relação às medidas publicadas na literatura (LITTLE, 1966; WERTHEIM, 1970; BAEK et al., 1998; TAIRA et al., 1994) estejam relacionadas com a linhagem do hospedeiro e do parasito, dose infectante e estágio de infecção em que as fêmeas parasitas foram recuperadas, meio de cultivo dos ovos e tempo de incubação das culturas. De fato, já foi demonstrado que o meio de cultura tem efeito significativo sobre o desenvolvimento morfológico de larvas L3 de *S. venezuelensis* (ISLAM et al., 1999). São necessárias análises morfométricas comparando formas evolutivas do parasito a partir de diferentes hospedeiros com utilização de diferentes meios de cultivo e tempos de incubação das culturas.

De acordo com a literatura, pode-se verificar que a identificação molecular específica de *S. venezuelensis* é pouco explorada. A maioria dos trabalhos que empregaram a técnica de PCR convencional para caracterização molecular do parasito utilizaram iniciadores gênero-específicos (PAULA et al., 2013; CHAVES et al., 2014). O único relato de PCR convencional que empregou iniciadores espécie-específicos para *S. venezuelensis* não apresentou resultados satisfatórios quando testados por nosso grupo. Em contrapartida, a técnica de *Touchdown PCR*, segundo o protocolo de Fernández-Soto e colaboradores (2016), que emprega iniciadores espécie-específicos, demonstrou ser adequada para a identificação do nematoide.

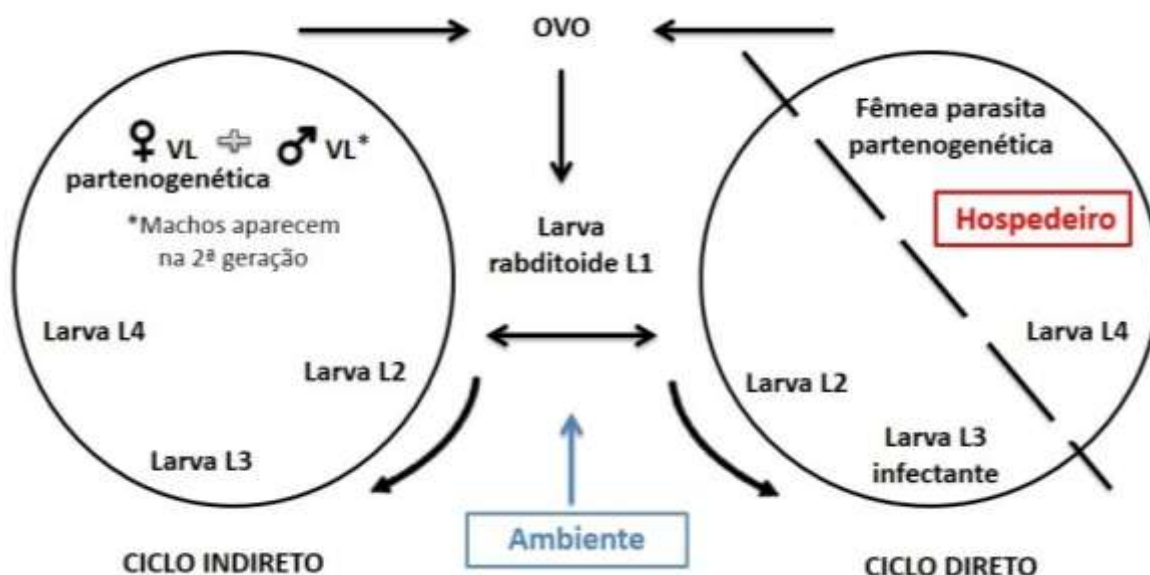
Por fim, devemos considerar que, teoricamente, existe a possibilidade de contaminação das culturas por outros nematoides de vida livre. Um

contaminante que merece atenção são os nematoides do gênero *Rhabditis*, que ocasionalmente podem viver como saprófitas ou parasitos de vertebrados (VICENTE et al., 1997). Sandground (1925) ao receber amostras de fezes humanas em que se encontravam várias formas de vida livre semelhantes a *S. stercoralis*, observou semelhança morfológica destas formas com *Rhabditis hominis* (Kobayashi, 1920). O autor realizou extensos estudos para verificar qual a provável fonte destas formas de vida livre e sugeriu que provavelmente estas seriam veiculadas por moscas. Além disso, Sandground (1925) verificou que estas larvas não causavam doenças ao homem, embora hoje seja conhecido um caso de parasitismo por *Rhabditis* sp em criança (CAMPOS et al., 2002).

De qualquer modo, nossos resultados não apontam para uma possível contaminação. Isso pode ser justificado pelas seguintes observações: 1- mesmo que seja possível uma contaminação das fezes por moscas ainda na gaiola anticoprofágica, essa suspeita não pode ser suportada uma vez que foi verificado que o fator que mais influenciou no desenvolvimento de fêmeas de vida livre de *S. venezuelensis* foi o tipo de hospedeiro utilizado (melhor com os ratos híbridos selvagens sob resfriamento prévio) e todos os animais utilizados nos experimentos sempre foram alojados no mesmo ambiente; 2- considerando que *Rhabditis* possui machos e fêmeas necessários para a propagação do ciclo de vida livre, não há razão para acreditar em contaminação de nossas amostras, uma vez que não foram encontrados machos de vida livre de primeira geração em nossas culturas. Estes apareceram apenas em gerações posteriores; 3- foi demonstrado que larvas rabditoides de *R. hominis* sempre se desenvolvem para adultos de vida livre e não são produzidas larvas filariiformes (SANDGROUND, 1925). No entanto, em nossas culturas de manutenção do ciclo de vida livre, na qual se observava um grande número de adultos com sua progênie, também era possível encontrar larvas filarioides, ainda que em pequeno número; 4- por fim, de acordo com a literatura, ao compararmos morfometricamente os machos de vida livre de *Rhabditis* spp. e de *Strongyloides* spp., pode-se verificar que machos de vida livre de espécies do gênero *Rhabditis* são significativamente maiores do que os das espécies do gênero *Strongyloides* (1.012 e 1.235 µm de comprimento para *R. costai* e *R.*

*freitasi*, respectivamente e 590 e 870  $\mu\text{m}$  para *S. venezuelensis*, respectivamente neste estudo e no de Little (1966) (MARTINS, 1985). Todas estas observações contrariam a possibilidade de contaminação das amostras de nossos experimentos por *Rhabditis* spp.

De acordo com os resultados obtidos neste estudo e os descritos na literatura, pode-se propor que o ciclo biológico de *S. venezuelensis*, em condições de laboratório, seja de acordo com a Figura 13. Resumidamente, a fêmea partenogenética parasita produz ovos que podem evoluir em um dos ciclos: direto ou indireto. No ciclo direto, as larvas rabditoides de primeiro estágio (L1) que eclodiram dos ovos originam larvas rabditoides de segundo estágio (L2) e posteriormente larvas filarioides de terceiro estágio (L3) que infectam um hospedeiro, gerando uma nova fêmea partenogenética parasita. Em condições de laboratório, de forma menos comum, os ovos de fêmeas parasitas podem dar origem a larvas rabditoides L1 que evoluem para larvas rabditoides L2, L3 e L4 (quarto estágio) até originarem fêmeas de vida livre partenogenéticas que iniciam a postura de ovos. Estes ovos, na grande maioria das vezes, evoluem para a geração de novos adultos de vida livre. Por motivos ainda desconhecidos, não são encontrados machos de vida livre de primeira geração. Estes aparecem apenas em gerações posteriores.



**Figura 13.** Proposta para o ciclo de vida de *Strongyloides venezuelensis* (em condições laboratoriais).

## 7. CONCLUSÕES

- a) Machos de vida livre de primeira geração de *S. venezuelensis* foram ausentes em culturas de amostras de fezes de camundongos suíços, gerbilos, ratos Wistar e ratos híbridos selvagens infectados com o parasito, cultivadas em vermicuita e em ágar, com variações na idade dos hospedeiros, na existência ou não de infecção prévia, na dose do inóculo e na temperatura de cultivo.
- b) A frequência de fêmeas de vida livre nos cultivos das amostras de fezes dos diferentes hospedeiros foi baixa nas diferentes condições de cultivo, exceto quando fezes de ratos híbridos selvagens foram submetidas à redução da temperatura (6°C) antes da incubação a 28°C, quando a frequência daquelas fêmeas aumentou significativamente.
- c) As fêmeas de vida livre de primeira geração foram capazes de manter o ciclo heterogônico do nematoide, inclusive com aparecimento de machos em gerações posteriores.
- d) O ciclo de vida livre de *S. venezuelensis* foi mantido no laboratório, em repiques sucessivos, aparentemente por fêmeas de vida livre partenogenéticas.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Albertson DG, Nwaorgu OC, Sulston JE. Chromatin diminution and a chromosomal mechanism of sexual differentiation in *Strongyloides papillosus*. **Chromosoma**. 1979; 75(1):75-87.
- Amarante AFT, Oliveira-Sequeira TCG. *Strongyloides venezuelensis* infection susceptibility of seven inbred strains of mice. **Arq Bras Med Vet Zootec**. 2002; 54(3):273-278.
- Arakaki T, Hasegawa H, Asato R, Ikeshiro T, Kinjo F, Saito A, Iwanaga M. A new method to detect *Strongyloides stercoralis* from human stool. **Jpn J Trop Med Hyg**. 1988; 16:11-17.
- Araújo P. Distribuição de helmintos no intestino delgado de *Rattus norvegicus* naturalmente infestados. II. *Strongyloides ratti*, Sandground, 1925 e *S. venezuelensis*, Brumpt, 1934. **Revista da Faculdade de Farmácia e Bioquímica da Universidade de São Paulo**. 1967; 1:179-190.
- Ashford RW, Barnish G, Viney ME. *Strongyloides fuelleborni kellyi*: infection and disease in Papua New Guinea. **Parasitol Today**. 1992; 8(9):314-318.
- Augustine DL. Experimental studies on the validity of species in the genus *Strongyloides*. **Am J Hyg**. 1940; 32:24-32.
- Baek BK, Islam MK, Kim BS, Lim CW, Hur J, Oluoch AO, Kim CH, Kakoma I. Characterization of the protective response against a homologous challenge infection with *Strongyloides venezuelensis* in rats. **Vet Parasitol**. 2003; 113(3-4):217-227.
- Baek BK, Islam MK, Matsuda K. Viability of eggs, filariform larvae and adults of *Strongyloides venezuelensis* (Nematoda: Strongyloidea) maintained in vitro. **Korean J Parasitol**. 1998; 36(2):99-107.
- Baek BK, Whang IS, Islam MK, Kim BS, Kakoma I. Persistent infection with *Strongyloides venezuelensis* in the Mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*). **Korean J Parasitol**. 2002; 40(4):181-186.
- Basir, MA. The morphology and development of the sheep nematode, *Strongyloides papillosus* (Wedl, 1856). **Can J Res**. 1950; 28:173-196.
- Beach TD. Experimental studies on human and primate species of *Strongyloides* – V. The free-living phase of the life cycle. **Am J Hyg**. 1936; 23:243-277.
- Beg MK. Studies on the life-cycle of *Strongyloides fuelleborni* von Linstow, 1905. **Ann Trop Med Parasitol**. 1968; 62:502-505.

- Benincasa CC, Azevedo FO, Canabarro MS, Valentim HM, Silva VD, Superti SV, Dias FS. *Strongyloides stercoralis* hyperinfection syndrome: case report. **Rev Bras Ter Intensiva**. 2007; 19(1):128-131.
- Blaxter ML, De Ley P, Garey JR, Liu LX, Scheldeman P, Vierstraete A, Vanfleteren JR, Mackey LY, Dorris M, Frisse LM, Vida JT, Thomas WK 1998. A molecular evolutionary framework for the phylum Nematoda. **Nature**. 1998; 392(6671):71-75.
- Bolla RI, Roberts LS. Gametogenesis and chromosomal complement in *Strongyloides ratti* (Nematoda: Rhabdiasoidea). **J Parasitol**. 1968; 54:849-855.
- Brumpt E. Précis de Parasitologie, 6th ed. **Masson et Cie**, Paris, 1934.
- Campos DMB, Araújo JLB, Vieira MCM, Damasceno F, Barbosa AP. Um caso de parasitismo por *Rhabditis* sp em criança natural de Goiânia, Goiás, Brasil. **Rev Soc Bras Med Trop**. 2002; 35:519-522.
- Chaves, LA. **Comparação dos métodos parasitológico, imunológico e molecular em amostras de fezes de ratos (*Rattus norvegicus* Wistar) imunossuprimidos experimentalmente infectados por *Strongyloides venezuelensis***. 2014. Dissertação (Mestrado em Imunologia e Parasitologia Aplicadas), Universidade Federal de Uberlândia, MG.
- Costa-Cruz, JM. *Strongyloides stercoralis*. In: NEVES, DP. **Parasitologia Humana**. 13ª ed., São Paulo: Atheneu. 2016; p. 313-323.
- Cunha RA, Carvalho EFG, Sousa JEN, Costa-Cruz JM. Excretory/secretory antigens of *Strongyloides venezuelensis* applied to IgG detection in human strongyloidosis. **Parasitol Int**. 2017; 66(5):671-676.
- Denver DR, Clark KA, Raboin MJ. Reproductive mode evolution in nematodes: insights from molecular phylogenies and recently discovered species. **Mol Phylogenet Evol**. 2011; 61(2): 584-592.
- Dorris M, Viney ME, Blaxter ML. Molecular phylogenetic analysis of the genus *Strongyloides* and related nematodes. **Int J Parasitol**. 2002; 32:1507-1517.
- Dulovic A, Puller V, Streit A. Optimizing culture conditions for free-living stages of the nematode parasite *Strongyloides ratti*. **Exp Parasitol**. 2016; 168:25-30.
- Eberhardt AG, Mayer WE, Streit A. The free-living generation of the nematode *Strongyloides papillosus* undergoes sexual reproduction. **Int J Parasitol**. 2007; 37: 989-1000.
- El-Malky MA, Maruyama H, Al-Harthi SA, El-Beshbishi SN, Ohta N. The role of B-cells in immunity against adult *Strongyloides venezuelensis*. **Parasit Vectors**. 2013; 6:148.
- Fernández-Soto P, Sánchez-Hernández A, Gandasegui J, Santos CB, López-Abán J, Saugar JM, Rodríguez E, Vicente B, Muro A. Strong-LAMP: a LAMP



assay for *Strongyloides* spp. detection in stool and urine samples. Towards the diagnosis of human strongyloidiasis starting from a rodent model. **PLoS Negl Trop Dis**. 2016; 10(7): e0004836.

Gemmill AW, Viney ME, Read AF. Host immune status determines sexuality in a parasitic nematode. **Evolution**. 1997; 51(2):393-401.

Gordon HM, Whitlock HV. A new technique for counting nematode eggs in sheep faeces. **J Counc Sci Ind Res**. 1939; 12:50-52.

Grant WN, Stasiuk S, Newton-Howes J, Ralston M, Bisset SA, Heath DD, Shoemaker CB. *Parastrongyloides trichosuri*, a nematode parasite of mammals that is uniquely suited to genetic analysis. **Int J Parasitol**. 2006; 36(4):453-466.

Grove DI. Human strongyloidiasis. **Adv Parasitol**. 1996; 38:251-309.

Gugosyan YA, Yevstafyeva VA, Gorb AO, Melnychuk VV, Yasnolob IO, Shendryk CM, Pishchalenko MA. Morphological features of development of *Strongyloides westeri* (Nematoda, Rhabditida) in vitro. **Regul Mech Biosyst**. 2018; 9(1):75-79.

Hammond MP, Robinson RD. Chromosome complement, gametogenesis, and development of *Strongyloides stercoralis*. **J Parasitol**. 1994; 80:689-695.

Hansen EL, Buecher EJ, Cryan WS. *Strongyloides fuelleborni*: environmental factors and free-living generations. **Exp Parasitol**. 1969; 26(3):336-343.

Harvey SC, Gemmill AW, Read AF, Viney ME. The control of morph development in the parasitic nematode *Strongyloides ratti*. **Proc Biol Sci**. 2000; 267(1457):2057-2063.

Harvey SC, Viney ME. Sex determination in the parasitic nematode *Strongyloides ratti*. **Genetics**. 2001; 158(4):1527-1533.

Hasegawa H, Orido Y, Sato Y, Otsuru M. *Strongyloides venezuelensis* Brumpt, 1934 (Nematoda: Strongyloididae) collected from *Rattus norvegicus* in Naha, Okinawa, Japan. **Jpn J Parasitol**. 1988; 37:429-434.

Hino A, Tanaka T, Takaishi M, Fujii Y, Palomares-Rius JE, Hasegawa K, Maruyama H, Kikuchi T. Karyotype and reproduction mode of the rodent parasite *Strongyloides venezuelensis*. **Parasitology**. 2014; 141(13):1736-1745.

Horii Y, Khan AI, Nawa U. Persistent infection of *Strongyloides venezuelensis* and normal expulsion of *Nippostrongylus brasiliensis* in Mongolian gerbils, *Meriones unguiculatus*, with reference to the cellular responses in the intestinal mucosa. **Parasite Immunol**. 1993; 15:175-179.

Hunt VL, Hino A, Yoshida A, Kikuchi T. Comparative transcriptomics gives insights into the evolution of parasitism in *Strongyloides* nematodes at the genus, subclade and species level. **Sci Rep**. 2018; 8(1): 5192.

Hunt VL, Tsai IJ, Coghlan A, Reid AJ, Holroyd N, Foth BJ, Tracey A, Cotton JA, Stanley EJ, Beasley H, Bennett HM, Brooks K, Harsha B, Kajitani R, Kulkarni A, Harbecke D, Nagayasu E, Nichol S, Ogura Y, Quail MA, Randle N, Xia D, Brattig NW, Soblik H, Ribeiro DM, Sanchez-Flores A, Hayashi T, Itoh T, Denver DR, Grant W, Stoltzfus JD, Lok JB, Maruyama H, Wastling J, Streit A, Kikuchi T, Viney M, Berriman M. The genomic basis of parasitism in the *Strongyloides* clade of nematodes. **Nat Genet.** 2016; 48(3):299-307.

Islam MK, Matsuda K, Kim JH, Baek BK. Effects of in vitro culture methods on morphological development and infectivity of *Strongyloides venezuelensis* filariform larvae. **Korean J Parasitol.** 1999; 37(1):13-19.

Jaleta TG, Zhou S, Bemm FM, Schär F, Khieu V, Muth S, Odermatt P, Lok JB, Streit A. Different but overlapping populations of *Strongyloides stercoralis* in dogs and humans-Dogs as a possible source for zoonotic strongyloidiasis. **PLoS Negl Trop Dis.** 2017; 11(8):e0005752.

Keiser PB, Nutman TB. *Strongyloides stercoralis* in the Immunocompromised Population. **Clin Microbiol Rev.** 2004; 17(1):208-217.

Khan AI, Horii Y, Tiuria R, Sato Y, Nawa Y. Mucosal mast cells and the expulsive mechanisms of mice against *Strongyloides venezuelensis*. **Int J Parasitol.** 1993; 23(5):551-555.

Koga K, Kasuya S, Khamboonruang C, Sukhavat K, Ieda M, Takatsuka N, Kita K, Ohtomo H. A modified agar plate method for detection of *Strongyloides stercoralis*. **Am J Trop Med Hyg.** 1991; 45(4):518-521.

Little MD. Comparative morphology of six species of *Strongyloides* (Nematoda) and redefinition of the genus. **J Parasitol.** 1966; 52(1):69-84.

Machado, GC. **Comparação da sensibilidade da técnica parasitológica (OPG) e da PCR para o diagnóstico de *Strongyloides venezuelensis* em fezes de ratos (*Rattus norvegicus*) da linhagem Lewis infectados experimentalmente.** 2008. Monografia (Graduação em Ciências Biológicas), Universidade Estadual Paulista, SP.

Machado ER, Ueta MT, Gonçalves-Pires MRF, Oliveira JB, Faccioli LH, Costa-Cruz JM. *Strongyloides venezuelensis* alkaline extract for the diagnosis of human strongyloidiasis by enzyme-linked immunosorbent assay. **Mem Inst Oswaldo Cruz.** 2003; 98:849-851.

Marques CC, da Penha Zago-Gomes M, Gonçalves CS, Pereira FE. Alcoholism and *Strongyloides stercoralis*: daily ethanol ingestion has a positive correlation with the frequency of *Strongyloides* larvae in the stools. **PLoS Negl Trop Dis.** 2010; 4(6):717.

Marra NM, Chiuso-Minicucci F, Machado GC, Zorzella-Pezavento SF, França TG, Ishikawa LL, Amarante AF, Sartori A, Amarante MR. Faecal examination

and PCR to detect *Strongyloides venezuelensis* in experimentally infected Lewis rats. **Mem Inst Oswaldo Cruz.** 2010; 105(1):57-61.

Martins JR., W. *Rhabditis (Rhabditis) freitasi* sp.n. e *Rhabditis (Rhabditis) costai* sp.n. (Nematoda: Rhabditidae) isolados de otite bovina. **Mem Inst Oswaldo Cruz.** 1985; 80 (1): 11-16.

Martins WA, Nicoli JR, Farias LM, Carvalho MAR, Cara DC, Melo AL. *Strongyloides venezuelensis*: efeito de antimicrobiano e imunossupressor no curso da infecção em camundongos da linhagem AKR/J. **Rev Ci Med Biol.** 2009; 8:315-324.

Maruyama H, Nawa Y. *Strongyloides venezuelensis*: adhesion of adult worms to culture vessels by orally secreted mucosubstances. **Exp Parasitol.** 1997; 85(1):10-15.

Maruyama H, Nishimaki A, Takuma Y, Kurimoto M, Suzuki T, Sakatoku Y, Ishikawa M, Ohta N. Successive changes in tissue migration capacity of developing larvae of an intestinal nematode, *Strongyloides venezuelensis*. **Parasitology.** 2006; 132(3):411-418.

Matsumoto M, Sasaki Y, Yasuda K, Takai T, Muramatsu M, Yoshimoto T, Nakanishi K. IgG and IgE Collaboratively Accelerate Expulsion of *Strongyloides venezuelensis* in a Primary Infection. **Infect Immun.** 2013; 81(7):2518-2527.

Melo AL, Mati VL, Martins WA. *Callithrix penicillata* as a nonhuman primate model for strongyloidiasis. **Primates.** 2012; 53(3):303-309.

Minato K, Kimura E, Shintoku Y, Uga S. Effect of temperature on the development of free-living stages of *Strongyloides ratti*. **Parasitol Res.** 2008; 102:315-319.

Minematsu T, Mimori T, Tanaka M, Tada I. The effect of fatty acids on the developmental direction of *Strongyloides ratti* first-stage larvae. **J Helminthol.** 1989; 63(2):102-106.

Moncol DJ, Triantaphyllou AC. *Strongyloides ransomi*: factors influencing the *in vitro* development of the free-living generation. **J Parasitol.** 1978; 64:220–225.

Moraes RG. Contribuição para o estudo do *Strongyloides stercoralis* e da estrogiloidose no Brasil. **Revista do Serviço Especial de Saúde Pública.** 1948; 1:507-624.

Nagayasu E, Ogura Y, Itoh T, Yoshida A, Chakraborty G, Hayashi T, Maruyama H. Transcriptomic analysis of four developmental stages of *Strongyloides venezuelensis*. **Parasitol Int.** 2013; 62(1):57-65.

Nakai ES, Amarante AFT. Infecção experimental de camundongos (*Mus musculus*) e ratos (*Rattus norvegicus*) com *Strongyloides venezuelensis*. **Rev Bras Parasitol Vet.** 2001; 10:1-6.

Nemetschke L, Eberhardt AG, Hertzberg H, Streit A. Genetics, chromatin diminution, and sex chromosome evolution in the parasitic nematode genus *Strongyloides*. **Curr Biol**. 2010; 20(19):1687-1696.

Nwaorgu OC. The development of the free-living stages of *Strongyloides papillosus*. I. Effect of temperature on the development of the heterogonic and homogonic nematodes in faecal culture. **Vet Parasitology**. 1983; 13(3):213-223.

Olsen A, Van Lieshout L, Marti H, Polderman T, Polman K, Steinmann P, Stothard R, Thybo S, Verweij JJ, Magnussen P. Strongyloidiasis-the most neglected of the neglected tropical diseases? **Trans R Soc Trop Med Hyg**. 2009; 103(10):967-972.

Paula FM, Sitta RB, Malta FM, Gottardi M, Corral MA, Gryscek RC, Chieffi PP. Parasitological and molecular diagnosis in experimental *Strongyloides venezuelensis* infection. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**. 2013; 55(2):141-143.

Pegoraro FI. **Influência da idade da infecção de *Strongyloides venezuelensis* Brumpt, 1934 (Nematoda: Rhabditida) em ratos e de fatores ambientais externos no desenvolvimento das formas de vida livre**. 1999. Dissertação (Mestrado em Parasitologia), Universidade Estadual de Campinas, SP.

Porto MA, Muniz A, Oliveira Júnior J, Carvalho EM. Clinical and immunological consequences of the association between HTLV-1 and strongyloidiasis. **Rev Soc Bras Med Trop**. 2002; 35(6):641-649.

Premvati. Studies on *Strongyloides* of Primates II. Factors determining the "direct" and the "indirect" mode of life. **Can J Zool**. 1958a; 36:185-195.

Premvati. Studies on *Strongyloides* of Primates III. Observations on the free-living generations of *S. fuelleborni*. **Can J Zool**. 1958b; 36:447-452.

Premvati. Effect of temperature on the development of free-living adults of *Strongyloides papillosus* (Wedl, 1856). **Parasitology**. 1963; 53:483-489.

Ribeiro SR, Maia CO, Pereira FE, Moreira NI. Comparative study of cultivation of feces in vermiculite or charcoal to obtain larvae of *Strongyloides venezuelensis*. **Rev Soc Bras Med Trop**. 2014; 47(5):657-658.

Rivero JC, Inoue Y, Murakami N, Horii Y. Age- and sex-related changes in susceptibility of Wistar rats to *Strongyloides venezuelensis* infection. **J Vet Med Sci**. 2002a; 64(6):519-521.

Rivero JC, Inoue Y, Murakami N, Horii Y. Androgen- and estrogen-dependent sex differences in host resistance to *Strongyloides venezuelensis* infection in Wistar rats. **J Vet Med Sci**. 2002b; 64(6):457-461.

Sandground JH. Biological studies on the life-cycle in the genus *Strongyloides* Grassi, 1879. **Am J Hyg.** 1926; 6:337-388.

Sandground JH. Observations on *Rhabditis hominis* Kobayashi in the United States. **J Parasitol.** 1925; 11(3):140-148.

Sakamoto M, Uga S. Development of free-living stages of *Strongyloides ratti* under different temperature conditions. **Parasitol Res.** 2013; 112(12):4009-4013.

Sasaki Y, Yoshimoto T, Maruyama H, Tegoshi T, Ohta N, Arizono N, Nakanishi K. IL-18 with IL-2 protects against *Strongyloides venezuelensis* infection by activating mucosal mast cell-dependent type 2 innate immunity. **J Exp Med.** 2005; 202(5): 607-616.

Sato Y, Toma H. *Strongyloides venezuelensis* infections in mice. **Int J Parasitol.** 1990; 20(1):57-62.

Schilter HC, Pereira AT, Eschenazi PD, Fernandes A, Shim D, Sousa AL, Teixeira MM, Negrão-Corrêa D. Regulation of immune responses to *Strongyloides venezuelensis* challenge after primary infection with different larvae doses. **Parasite Immunol.** 2010; 32(3):184-192.

Shiwaku K, Chigusa Y, Kadosaka T, Kaneko K. Factors influencing development of free-living generations of *Strongyloides stercoralis*. **Parasitology.** 1988; 97:129-138.

Sitta RB, Malta FM, Pinho JR, Chieffi PP, Gryscek RC, Paula FM. Conventional PCR for molecular diagnosis of human strongyloidiasis. **Parasitology.** 2014; 141(5):716-721.

Speare R. Identification of species of *Strongyloides*. In Strongyloidiasis: A Major Roundworm Infection of Man, D.I. Grove, ed. (London: Taylor and Francis), 1989; 11-84.

Streit A. Reproduction in *Strongyloides* (Nematoda): a life between sex and parthenogenesis. **Parasitology.** 2008; 135(3):285-294.

Taira N, Hirooka M, Saeki H. Isolation of *Strongyloides venezuelensis* from *Rattus norvegicus* in Kagoshima Prefecture. **J Vet Med Sci.** 1994; 56(2):255-258.

Takamure A. Migration route of *Strongyloides venezuelensis* in rodents. **Int J Parasitol.** 1995; 25(8):907-911.

Tamura N. Studies on availability of *Strongyloides venezuelensis* for experimental model of strongyloidosis. **Bull Nip Vet Anim Sci University.** 1993; p.94-96.

- Taylor KA, Weinstein PP. The effect of oxygen and carbon dioxide on the development of the free-living stages of *Strongyloides ratti* in axenic culture. **J Parasitol.** 1990; 76(4):545-551.
- Triantaphyllou AC, Moncol DJ. Cytology, reproduction, and sex determination of *Strongyloides ransomi* and *S. papillosus*. **J Parasitol.** 1977; 63(6):961-973.
- Vicente JJ, Rodrigues HO, Gomes DC, Pinto RM. Nematoides do Brasil. Parte V: nematoides de mamíferos. **Rev Bras Zool.** 1997; 14 (Supl. 1): 1-452.
- Viney ME. A genetic analysis of reproduction in *Strongyloides ratti*. **Parasitology.** 1994; 109:511-515.
- Viney ME. Developmental switching in the parasitic nematode *Strongyloides ratti*. **Proc Biol Sci.** 1996; 263(1367):201-208.
- Viney ME. Exploiting the life cycle of *Strongyloides ratti*. **Parasitol Today.** 1999; 15(6):231-235.
- Viney M, Kikuchi T. *Strongyloides ratti* and *S. venezuelensis* - rodent models of *Strongyloides* infection. **Parasitology.** 2017; 144(3):285-294.
- Viney ME, Lok JB. *Strongyloides* spp. **WormBook.** 2007; 23:1-15.
- Viney ME, Lok JB. The biology of *Strongyloides* spp. **WormBook.** 2015; 16:1-17.
- Viney ME, Matthews BE, Walliker D. Mating in the nematode parasite *Strongyloides ratti*: proof of genetic exchange. **Proc Biol Sci.** 1993; 254(1341):213-219.
- Wertheim G. Growth and development of *Strongyloides venezuelensis* Brumpt, 1934 in the albino rat. **Parasitology.** 1970; 61(3):381-388.
- Wertheim G, Lengy J. The seasonal occurrence of *Strongyloides ratti* Sandground, 1925 and *S. venezuelensis* Brumpt 1934, in a population of *Rattus norvegicus*. **J Helminthol.** 1964; 38:393-398.
- Yamada M, Matsuda S, Nakazawa M, Arizono N. Species-specific differences in heterogonic development of serially transferred free-living generations of *Strongyloides planiceps* and *Strongyloides stercoralis*. **J Parasitol.** 1991; 77(4): 592-594.
- Yasuda K, Matsumoto M, Nakanishi K. Importance of both innate immunity and acquired immunity for rapid expulsion of *S. venezuelensis*. **Front Immunol.** 2014; 5:118.
- Zaffagnini F. Parthenogenesis in the parasitic and free-living forms of *Strongyloides papillosus* (Nematoda, Rhabdiasoidea). **Chromosoma.** 1973; 40(4):443-450.

## ANEXO

**Amostras de DNA de *S. venezuelensis* utilizadas para *Touchdown PCR***

<b>Amostra</b>	<b>Fonte/Tratamento</b>	<b>Concentração DNA* (ng/μL)</b>
3 (Controle +)	Larvas L3 (Botucatu-SP)	26,8
4	Fezes - N <sub>2(l)</sub> 1x	42
5	Fezes - Etanol 1x + PBS 2x	11,4
6	Fezes - Tampão ASL 2x +N <sub>2(l)</sub> 1x	24,2
7	Fezes - N <sub>2(l)</sub> 2x	42,3
8	Sedimento centrífugo- sedimentação + N <sub>2(l)</sub> 2x	23,9
9	Fezes + L1 + N <sub>2(l)</sub> 2x	7,3
10	Larvas L3	21,2
11	Larvas L3	16,5

\*Dosagem realizada em aparelho NanoDrop™ 2000 UV-VIS Spectrophotometers (Thermo Fisher Scientific®).